آزمایشگاه ژنتیک ۲

از استخراج DNA تا الکتروفورز



VISIT…

LANZAROTE

Caliente.com

آزمایش شماره ۱ :

محلول سازی:

محلولسازی یکی از ابتدایی ترین کارها و لازمه کار هر آزمایشگاهی می باشد و عبارتست از حل کردن یک ماده حل شونده در یک مایع حلال که مقدار دقیق ماده حل شونده باید معلوم باشد. همچنین از آنجا که مطالعه بسیاری از واکنشهای بیولوژیک در محیط آزمایشگاه نیازمند استفاده از محلولهای بافری است و این محلولها معمولا در آزمایشگاه به صورت غلیظ و با درصد خلوص مشخص و استاندارد به صورت stock (ذخیره) نگهداری می شوند لذا فراگیری چگونگی رقیق کردن این محلولها جهت تهیه بافرهای مورد نیاز روزانه یا محلول کار از محلول های stock ضروری است.

برای این کار از روابط رقیق سازی استفاده می کنیم :

N_1 : نرمالیته محلول غلیظ

N_2 : نرمالیته محلول مورد نظر

V_1 : حجم محلول غلیظ

V_2 : حجم محلول مورد نظر

M : مولاریته

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

یا

$$M_1V_1 = M_2V_2$$

در رابطه بالا نیاز است که نرمالیته یا مولاریته محلول غلیظ موجود در ازمایشگاه را تعیین کنیم. در رابطه اول فقط حجم محلول غلیظ (V1) مجهول است که محاسبه می شود و فقط کافی است این مقدار (V1)را از محلول غلیظ برداشته و به حجم مورد نظر (V2) برسانیم.

قبل از اینکه به نرمالیته و مولاریته بپردازیم به مفهوم در صد وزنی و غلظت که در محلولسازی مورد استفاده قرار می گیرند اشاره می کنیم:

در صد وزنی:

عبارتست از جرم ماده حل شونده در ۱۰۰ میلی لیتر محلول

مثال: برای ساختن ۲۰۰ میلی لیتر محلول ۵ در صد کلرید سدیم چه مقدار از ماده حل شونده و حلال نیاز داریم؟

۵ gr ۱۰۰ cc

X ۲۰۰ cc

۱۰ gr =۱۰۰÷۲۰۰ ×۵

در نتیجه به ۱۰ گرم ماده حل شونده نیاز داریم که باید حجم آن را با آب به ۲۰۰ میلی لیتر برسانیم.

غلظت:

بیان کننده مقدار گرمی از ماده حل شونده است که در یک لیتر محلول حل شده باشد و به صورت گرم در لیتر بیان می شود.

مثال: وقتی ۵ گرم گلوکز در ۲۰۰ میلی لیتر از محلولی حل شده باشد، غلظت محلول چقدر خواهد بود؟

۵ gr ۲۰۰ cc

X ۱۰۰۰ cc

۵×۱۰۰۰÷۲۰۰ = ۲۵ gr/lit

غلظت این محلول ۲۵ گرم بر لیتر می باشد

مولاریته (M):

مولاریته‌ی یک محلول برابر است با تعداد مول‌های ماده حل شده در هر لیتر آن محلول. این روش بیان غلظت بیش‌ترین کاربرد را در محلول‌سازی دارد. یک مول برابر است با تعداد ۶/۰۲۲×۱۰^{۲۳} (عدد آووگادرو) مولکول از ماده. برای این که تعداد مولکول‌های ماده را در محلول اندازه بگیریم از مفهوم جرم مولی استفاده می‌کنیم.

محلول ۱ مول ماده‌ی حل‌شونده در ۱ لیتر محلول، محلولِ ۱ مولار آن ماده‌ی حل‌شونده نامیده می‌شود.

هر ماده با توجه به تعداد و نوع اتم‌هایی که در هر مولکول‌ش دارد، جرم مولی متفاوتی هم دارد. استفاده از واژه‌ی «جرم مولکولی» به جای «جرم مولی» رایج است. بنابراین جرم مولکولی (مولی) نوشته شده بر روی لیبل ظروف نگهداری مواد معادل با ۱ مول از آن ماده می باشد که قبلا ا ز طریق ضرب عدد آووگادرو در جرم مولکولی آن ماده به دست آمده است.

به طور مثال محلول ۱ مولار کلریدسدیم شامل ۱ مول کلریدسدیم در یک لیتر محلول است. که با توجه به وزن مولکولی کلریدسدیم که برابر با ۵۸/۴۴ گرم (می‌فهمیم برای تهیه‌ی ۱۰۰۰ سی‌سی محلول یک مولار آن باید به همین اندازه از پودر کلریدسدیم را با ترازو وزن کنیم و روی آن آب بریزیم تا حجم آن به ۱۰۰۰ سی‌سی برسد.

با نگاهی به آن چه گفتیم درمی‌یابید که با وزن‌کردن ماده‌ی موردنظرتان و تقسیم آن بر جرم مولی ماده می‌توانید تعداد مول‌های موجود در آن مقدار ماده را به دست بیاورید و برای محلول‌سازی استفاده کنید.

مثال: اگر بخواهیم ۲۵۰ میلی‌لیتر محلولی از اسیدنیتریک بسازیم که غلظت آن ۲ مولار باشد، با توجه به جرم مولکولی اسیدنیتریک (= جرم یک مول از آن (که برابر با ۶۳/۰۱ گرم است به روش زیر می‌توانیم محاسبه کنیم. در این روش ابتدا مقدار گرمی از اسیدنیتریک که برای تهیه‌ی ۱ لیتر) =۱۰۰۰ سی‌سی (محلول ۲ مولار لازم است را محاسبه می‌کنیم:

۶۳/۰۱ gr/litre	۱ molar	۶۳/۰۱×۲÷۱ = ۱۲۶/۰۲ gr/lit
X	۲ molar	

سپس باید مقدار گرم موردنیاز را برای ۲۵۰ سی‌سی حساب کرد:

۱۲۶/۰۲ gr	۱۰۰۰ cc	۱۲۶/۰۲×۲۵۰÷۱۰۰۰ = ۳۱/۵۰۵ gr
X	۲۵۰ cc	

بنابراین برای آماده‌کردن محلولی با مشخصات بالا باید مقدار ۳۱/۵۰۵ گرم از اسیدنیتریک را وزن کنید و در یک ظرف مدرج (ارلن یا بالن) بریزید. بعد روی آن آب‌مقطر اضافه کنید تا به علامت ۲۵۰ سی‌سی برسد.

راه حل دیگر:

مقدار ماده برداشتی از ماده اولیه = وزن مولکولی×غلظت مورد نیاز×حجم مورد نیاز

$$250 \times 2 \times 63.01 = 31.505$$

مثال: اگر بخواهیم ۱۰۰ میلی لیتر محلول EDTA ۰/۵ مولار بسازیم با توجه به اینکه جرم مولکولی (جرم یک مول از آن) برابر با ۳۷۲/۲۴ گرم است به روش زیر عمل می کنیم:

1 mol 372.24 gr/lit
0.5 X ⟹ X= 372.24 × 0.5 ÷ 1= 186.1

186.1 gr 1000cc
X 100cc ⟹ X= 186.1×100÷1000=18.612

۱۸/۶۱۲ گرم از EDTA باید برداریم و به حجم ۱۰۰ میلی لیتر برسانیم.

راه حل دیگر:

وزن مولکولی×غلظت مورد نیاز×حجم مورد نیاز= مقدار ماده برداشتی از ماده اولیه

$$X= 100 \times 0.5 \times 372.24 = 18.612$$

مثال: برای تهیه ۵۰ میلی لیتر TE از بافر ۱۰ میلی مولار Tris و بافر ۱ میلی مولار EDTA چگونه عمل کنیم؟

$$M1\ V1 = M2\ V2$$

از آنجا که محلول stock بافر Tris با غلظت ۱ مولار (۱۰۰۰ میلی مولار) و stock بافر EDTA با غلظت ۰/۵ مولار (۵۰۰ میلی مولار) در آزمایشگاه نگهداری می شوند بنابراین میزان M1 برای محاسبه هریک از بافرهای مذکور به ترتیب ۱۰۰۰ و ۵۰۰ خواهد بود.

بنابراین برای بافر Tris خواهیم داشت:

$$1000\ m\mu \times V1 = 10\ m\mu \times 50\ ml \Longrightarrow V1 = 0.5\ ml = 500\ \mu l$$

و برای بافر EdTA داریم:

$$500\ m\mu \times V1 = 1\ m\mu \times 50\ ml \Longrightarrow V1 = 0.1\ ml = 100\ \mu l$$

بنابراین باید ۵۰۰ µl از بافر Tris و ۱۰۰ µl از بافر EDTA را در ظرف مدرج ریخته و حجم آن را به ۵۰ میلی لیتر می رسانیم.

مثال: روش کار برای ساخت ۵۰۰ میلی لیتر TBE 0.5X از بافر TBE 10X چیست؟

$$10X \times V1 = 0.5X \times 500\ ml \Longrightarrow V1 = 25\ ml$$

$$500 - 25 = 475\ ml$$

روش کار: ۲۵ میلی لیتر از بافر TBE 10X برداشته و حجم آن را با افزودن ۴۷۵ میلی لیتر آب مقطر به ۵۰۰ میلی لیتر می رسانیم.

نرمالیته:

تعداد اکیوالان گرمهای جسم حل شده در یک لیتر محلول. محلول نرمال (N) ، محلولی است که یک اکی والان گرم ماده حل‌شونده در یک لیتر آن و یا یک میلی‌اکی‌والان گرم در هر لیتر آن حل شده باشد.
مفهوم اکی والان گرم: مقدار وزن اکی والان مواد مختلف طبق رابطه زیر به دست می‌آید:

$$E = M/n$$

که M ، جرم مولکولی و n ظرفیت آن ماده است . n برای مواد مختلف به قرار زیر بدست می‌آید:
مقدار n برای اسیدها برابر تعداد هیدروژن‌های اسیدی و برای بازها، برابر تعداد OH- ، برای نمک‌ها برابر ظرفیت فلز ضرب‌در تعداد فلز و برای واکنش‌های اکسایش- کاهش برابر درجه کاهش یا اکسایش است.

برای تعیین نرمالیته از فرمول زیر استفاده می کنیم :

N : نرمالیته
a : دانسیته محلول
d : درصد خلوص محلول
E : اکی والان

نرمالیته $N = \frac{10ad}{E}$

نرمالیته محلول غلیظ (stock) را از فرمول بالا می توانیم بدست آوریم. البته برای تعیین نرمالیته و مولاریته محلول های ازمایشگاهی می توانید از جدول زیر نیز استفاده کنید. که در این صورت فقط به رابطه N1V1 = N2V2 نیاز خواهید داشت که در آن فقط حجم محلول غلیظ (V1) مجهول است که محاسبه می شود و فقط کافی است این مقدار (V1)را از محلول غلیظ برداشته و به حجم مورد نظر (V2) برسانیم.

نام محلول	چگالی	نرمالیته	مولاریته
اسید استیک 99.5%	1.05	17.5	17.5
اسید سولفوریک 98%	1.84	36.8	18.4
اسید نیتریک 70%	1.42	15.8	15.8
اسید هیدروکلریدریک 40%	1.13	22.6	22.6
اسید هیدروکلریدریک 36%	1.18	11.65	11.65
اسید هیدروکلریدریک 32%	1.16	10.2	10.2
اسید پرکلریک 70%	1.67	11.6	11.6
اسید پرکلریک 60%	1.54	9.2	9.2
امونیاک 35%	0.88	18.1	18.1
امونیاک 25%	0.91	13.4	13.4
هیدروکسید سدیم 47%	1.50	17.6	17.6

اطلاعاتی نظیر دانسیته , درصد خلوص , جرم مولکولی و ... را می توانید از برچسب روی ظرف محلول بدست اورید.

مثال: cc۱۰۰ محلول اسید سولفوریک ۲ نرمال تهیه کنید ؟

نرمالیته $N = \frac{10ad}{E} = \frac{10 \times 98 \times 1.84}{98/2} = 36.8\ N$

$$N_1V_1 = N_2V_2$$
$$36.8 \times V_1 = 2 \times 100$$
$$V_1 = 5.43\ cc$$

مقدار ۵/۴۳ میل لیتر از محلول غلیظ اسید سولفوریک برداشته و به حجم cc۱۰۰ برسانید. (در بالون ژوژه cc۱۰۰)

تذکر : در مورد اسید های غلیظ و قوی مثل اسید سولفوریک همیشه اسید را به اب اضافه می کنیم. (قبل از اضافه کردن اسید مقداری اب مقطر در بالون بریزید و سپس اسید را اضافه کنید.)

برای محلول سازی از مواد جامد ازمایشگاه از رابطه زیر استفاده کنید :

$$\text{نرمالیته محلول} \times \frac{\text{حجم محلول}\ (cc)}{1000\ (cc)} \times \frac{\text{جرم مولکولی ماده جامد}\ (gr)}{1\ mol} = (gr)\ \text{مقدار ماده جامد}$$

فقط کافی است مقدار ماده جامد بدست امده را در مقداری اب مقطر حل کرده و به حجم مورد نظر برسانید.

مثال :

۵۰ میل لیتر محلول یک نرمال یدید پتاسیم تهیه کنید؟

(جرم مولکولی یدید پتاسیم : ۱۶۶grگرم)

$$1\,N \times \frac{50\ cc}{1000\ cc} \times \frac{166\ gr}{1\ mol} = 8.3\ gr$$

اگر دقیقا ۸/۳ گرم از یدید پتاسیم را در ۵۰ میلی لیتر آب مقطر حل کنیم محلول یک نرمال بدست خواهد امد.

آزمایش شماره ۲:

استخراج DNA از خون انسان با استفاده از تکنیک Salting Out

مقدمه:

استخراج DNAی ژنومی با کمیت و کیفیت مطلوب اولین و مهم ترین نیاز در اجرای تحلیل های ژنتیکی، مانند تشخیص جهش و پی بردن به توالی و عملکرد بخش ویژه ای از ژنوم، است.

مرحله اساسی و مهم در انجام PCR و مطالعات مولکولی، تخلیص DNA می باشد، لذا برای جلوگیری از اشتباهات و اشکالاتی که ممکن است در PCR پیش آید، استخراج DNA نیاز به وقت و دقت خاصی داشته و شرایط ویژه ای باید رعایت گردد. از شرایط اساسی نمونه استخراج شده آن است که نمونه حداقل حاوی یک زنجیره DNA سالم، باغلظت بالا باشد و اینکه از کیفیت مناسبی برخوردار بوده و ناخالصی ها (آلودگی با پروتئینها، چربیها، RNA و سایر ترکیبات سلولی به جز DNA) تا حدی کم باشد که پلیمریزاسیون را مهار ننماید.

روشهای مختلفی جهت استخراج DNA به کار گرفته می شوند که از آن جمله می توان به موارد زیر اشاره کرد:

- روش Salting Out (نمکی)
- روش Boiling (جوشاندن)
- روش فنل- کلروفرم
- روش پروتئیناز k
- استفاده از کیت های تجاری

اصول کلی استخراج در تمامی انواع روشها یکسان است و بر مراحل زیر استوار می باشند:

۱) شکستن سلول برای از بین بردن دیواره هسته که معمولاً با استفاده از شوک اسمزی و دترجنت ها ی یونی ، مانند تریتون یا تریس، صورت می گیرد.

۲) هضم پروتئینها با استفاده از دترجنتهای یونی، مانند سدیم دودسیل سولفات (SDS)، که سبب تخریب غشاء سلولی و پروتئین متصل به DNA می شود، انجام می شود. تیمار آنزیمی (پروتئیناز K) نقش پروتئین زدایی دارد. به طور طبیعی DNA در سلول ها به صورت کمپلکس DNA و پروتئین می باشد. بعلاوه پروتئین ها و لیپیدهای سلول نیز باید از اسید نوکلئیک جدا شوند که در این مورد نیز از ترکیبات مختلفی استفاده می شود. معمولاً از مواد دترجنت برای از بین بردن واکنش های یونی بین هیستون های با بار مثبت و اسکلت حامل بار منفی DNA استفاده می شود. رایج ترین دترجنت مورد مصرف دترجنت آنیونی SDS می باشد که به پروتئینها متصل شده و به آنها مقدار زیادی خاصیت آنیونی می دهد؛ در نتیجه واکنشهای یونی کمتری بین هیستونها و DNA ایجاد می شود. نقش دیگر SDS دناتوره کردن دزاکسی ریبونوکلئازها و سایر پروتئینها می باشد تا SDS

رسوب نکند. جهت دپروتئینه کردن بهتر می توان از پروتئیناز K که یک پروتئیناز عمومی است در حضور SDS استفاده نمود. از آنجایی که این آنزیم فعالیت بالایی داشته و قادر به هضم پروتئین های دست نخورده است و از سویی دیگر چون سوبستراهای مورد هضم این آنزیم بسیار متنوع می باشد، کاربرد قابل توجهی در مراحل تخلیص اسیدهای نوکلئیک دارد. این آنزیم فعالیت خود را در حضور SDS حفظ می نماید. این خاصیت آنزیم به ما امکان می دهد تا ازآن همراه با لیز کردن سلول ها که توام با آزادی فوری نوکلئاز ها است استفاده نماییم. pH مطلوب عملکرد این آنزیم ۱۲– ۷/۵ است ولی غالباً در محدوده ۹– ۷/۹ به کار می رود و شرایط محلول واکنش که مناسب فعالیت این آنزیم است TES با pH = ۷/ ۸ می باشد.

۳) رسوب پروتئین ها . در DNA حاصل از هضم ناخالصی هایی وجود دارد. جهت رسوب پروتئین ها از محلول نمک NaCl اشباع (۶ مولار) استفاده می شود تا با کمک آن پروتئین های اضافی به نمک باند شده و رسوب نمایند و DNA برای مرحله رسوب دادن آماده گردد..

۴) رسوب دادن DNA که معمولا با استفاده از اتانول مطلق سرد و یا ایزوپروپانل سرد انجام می شود. افزودن الکل سبب کاهش قطبیت محیط آبی شده و به توده ای شدن رشته های محلول DNA و تجمع آنها کمک کرده و در نتیجه سبب رسوب DNA می شود. الکل سبب توده شدن رشته های محلول DNA و نیز تجمع آنها می گردد.

۵) انحلال رسوب DNA که معمولاً در بافر TE (Tris-HCL,EDTA) حل می نمایند. EDTA یون های فلزی لازم برای فعالیت DNAase را مهار می کند و pH فوق دآمیناسیون بازها را به حداقل می رساند.

علاوه بر موارد ذکر شده نکات دیگری نیز باید مورد توجه قرار گیرند، از جمله:

- آنزیم های مختلفی در سلول وجود دارد که می توانند DNA را تجزیه کنند و به آنزیم های DNase معروفند. مهمترین آسیب از جانب دزاکسی ریبونوکلئازها می باشد که هیدرولیز اتصالات فسفودی استر را کاتالیز می کنند. یون های+Mn2 و +Mg2 کوفاکتور این نوکلئازها هستند، لذا با افزودن EDTA به محلول استخراج DNAمی توان با شلات کردن این یون ها عمل مخرب این آنزیم ها را مهار کرد. از سوی دیگر یون های فلزی دوظرفیتی می توانند با گروه های آنیونی فسفات روی DNA ایجاد نمک کنند. +Mg2 می تواند واسطه اتصال پروتئین ها و اسیدهای نوکلئیک به یکدیگر باشد که وجود EDTA مانع بروز اینگونه مشکلات می گردد. محیط مناسب برای محلول بودن DNA، محلول حاوی EDTA که به میزان مناسبی دارای املاح نیز می باشد،است. DNA در محلول های نمکی پایدارتر و محلول تر است.
- pH محیط نیز باید قلیایی و ملایم و در حدود ۸ باشد، زیرا در این pH میزان بار مثبت هیستون ها کاهش یافته و در نتیجه واکنش های الکترواستاتیک بین DNA و هیستون ها کاهش یافته و همچنین فعالیت نوکلئازها در این pH کمتر می گردد. از سوی دیگر pH نسبتاً بالا در جهت دناتوره کردن پروتئین نیز عمل می‌کند.

الف: استخراج DNA به روش Salting out:

روش تهیه محلول های مورد نیاز:

- محلول Stock Tris 1M: برای تهیه ۲۵۰ میلی لیتر محلول Tris 1M ، 30.3gr از Tris را وزن کرده وحجم را به ۲۵۰ میلی لیتر می رسانیم و PH آن را به ۷/۵ می رسانیم.

- محلول Stock EDTA 0.5M: برای تهیه ۱۰۰۰ میلی لیتر محلول EDTA 0.5M مقدار 186.12gr از EDTA را وزن کرده و آن را با آب مقطر به حجم یک لیتر رسانده و حل می کنیم. PH محلول باید حدود ۸ باشد.

- محلول Nacl 6M (نمک اشباع): ۲۹/۲۲ gr سدیم کلراید را در یک لیتر آب مقطر حل کرده و برای اشباع کردن مرتبا سدیم کلراید ریخته هم می زنیم به حدی که دیگر حل نشود.

- محلول Stock NaCl 1M: برای تهیه ۵۰۰ میلی لیترمحلول NaCl 1M مقدار ۲۹/۲۲ گرم از NaCl را در ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل می کنیم.

- محلول TES (Tris-EDTA-Salt): این محلول از Tris 1M ، EDTA 0.5M و NaCl 1M تشکیل شده است. برای درست کردن ۱۰۰۰ میلی لیتر از محلول TES ابتدا ۱۰ میلی لیترمحلول Tris 1M ، ۲۰ میلی لیتر از محلول EDTA 0.5M و۱۵۰ میلی لیتر NaCl 1M برداشته، با هم مخلوط می کنیم و در نهایت حجم نهایی را با آب مقطر به ۱۰۰۰ میلی لیتر می رسانیم.

- محلول SDS 10%: ۱۰ گرم از SDS را در آب مقطر حل می کنیم و حجم نهایی را به ۱۰۰ میلی لیتر می رسانیم.

مراحل استخراج DNA از خون به روش Salting out:

۱- مقدار ۳۰۰ مایکرولیتر خون وریدی را در لوله حاوی μl ۲۰۰ EDTA ۰/۵ مولار (به عنوان ماده ضد انعقاد) ریخته خوب مخلوط نموده تا لخته نشود . هپارین نیز مانند EDTA از مواد ضد انعقاد به شمار می‌رود اما به دلیل اینکه باعث غیرفعال شدن taq polymerase می‌شود لذا در خونی که به هدف استخراج DNA ،برای انجام PCR ، گرفته می‌شود نباید استفاده شود.

۲- **جهت لیز کردن گلبولهای قرمز خون** در حدود دو برابرحجم اولیه (۳۰۰ مایکرولیتر) یعنی ۶۰۰ مایکرولیتر آب مقطر سرد اضافه می کنیم و به خوبی تکان می دهیم و به مدت ۳ دقیقه با دور۴۵۰۰ -۳۵۰۰ دور در دقیقه (rpm) سانتریفوژ می کنیم. در پایان این مرحله یک رسوب (pellet) سفید رنگ خیلی فشرده در ته لوله داریم و محلول رویی(supernatant) حاوی گلبولهای قرمز متلاشی شده است که با کج کردن لوله این محلول را خارج می کنیم. روش دیگر برای لیز کردن گلبولهای قرمز استفاده از ml ۱، Lysis Buffer است که شامل ترکیبی از مواد زیر در حجم نهایی ۵۰ میلی لیتر می باشد:

* Tris-HCl (PH7.6) 1μ ….. 10ml
* $MgCl_2$ 1μ ……. 5ml
* Sucrose 32 μ ….109.5 gr (محلول ایزوتونیک)
* Triton X100 …...10 ml

۳- مرحله قبلی را مجددا با ۱۵۰ مایکرولیتر آب مقطر یا ۲۰۰ مایکرولیتر Lysis Buffer ، دو تا سه بار تکرار می کنیم تا مابقی گلبولهای قرمز لیز شوند در واقع این کار را تا تمیز شدن رسوب از گلبولهای قرمز ادامه می دهیم و محلول رویی را خارج می کنیم و رسوب را که شامل گلبولهای سفید است نگه می داریم.

۴- **جهت لیز کردن گلبولهای سفید خون** به میکروتیوب‌های حاوی رسوب، مقدار۴۵۰ مایکرولتر بافر هضم کننده TES (Tris, EDTA,Salt) اضافه کرده به خوبی تکان می دهیم تا رسوب بدست آمده کاملا به حالت محلول در آید. Tris درحفاظت و نگهداری از DNA نقش دارد. EDTA علاوه بر ایجاد محیط مناسب جهت محلول بودن DNA ، در مهار DNaseها نیز نقش دارد. Salt یا NaCl باعث باند شدن پروتئین به نمک و در نهایت جدا شدن پروتئین می کند. در این مرحله می توانیم نمونه را جهت توقف کار در فریزر نگه داریم و بقیه مراحل را بعدا انجام دهیم در غیر اینصورت ادامه مراحل را طی می کنیم .

۵- مقدار μl ۲۵، ٪۱۰SDS اضافه می‌کنیم SDS (سدیم دودسیل سولفات) یک ماده پاک کننده (دترجنت) محسوب می شود که در این مرحله اسیدهای چرب جدار گلبولهای سفید را حل می‌کند. سپس ۵۰μl، پروتئیناز K با غلظت mg/ml ۲۰ اضافه می‌کنیم و از ۳ تا ۲۴ ساعت می توان درون بن ماری °C ۵۶ قرار می‌دهیم. این مرحله باعث پاره شدن غشاء سلولی و هسته گشته و رشته های DNA آزاد می گردد.

۶- **برای رسوب و جداسازی پروتئین ها** بعد ازگذشت زمان مورد نظر و لیز شدن گلبولهای سفید، یک سوم حجم محلول اولیه (۳۰۰ مایکرولیتر) یعنی ۱۰۰ مایکرولیتر Nacl اشباع ۶ مولار به میکروتیوب اضافه کرده و آنرا یکی دوبار تکان داده تا کدر شود و به مدت ۳ دقیقه با دور۴۵۰۰ -۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ انجام می دهیم .

۷- محلول رویی (supernatant) که حاوی DNA می باشد را به لوله دیگری انتقال داده و به آن ایزوپروپانول سرد اضافه نموده به آرامی تکان می دهیم تا زمانیکه کلاف DNA ظاهر گردد. در واقع الکل عمل آب گیری و در نتیجه ظهورکلاف DNA را انجام می دهد .

۸- سپس DNA را به میکروتیوب ۱/۵ ml دیگری انتقال داده با دور ۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ ثانیه سانتریفوژ کرده که DNA به ته میکروتیوب بچسبد.

۹- بعد مایع رویی که حاوی ایزوپروپانل و نمک می باشد را خالی کرده و سپس آنرا دوبار با الکل ۷۰ درصد شستشو می دهیم ، جهت شستشوی DNA مقدار ۱ ml الکل (متانل) ۷۰ درصد سرد به میکروتیوب اضافه کرده و پس از تکان دادن میکروتیوب آنرا به مدت ۳۰ ثانیه با دور ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ می کنیم، بقایای الکل را خارج می نماییم.

۱۰- سپس میکروتیوب حاوی DNA را به مدت ۳۰ دقیقه در مجاورت هوا قرار می دهیم تا الکل باقیمانده تبخیر شود . سپس به DNA بدست آمده به نسبت حجم آن ۵۰ الی ۲۰۰ میکرولیتر محلول TE (Tris-Hcl , EDTA) اضافه کرده و آنرا در یخچال و برای مدت طولانی تری در فریزر نگهداری می نمائیم.

ب: استخراج DNA به روش جوشاندن :

مواد مورد نیاز:

۱ – بافر لیز کننده گلبولهای قرمز

۲ – هیدروکسید سدیم (NaOH) 50 میلی مولار

۳ – Tris یک مولار

روش کار:

نیـم میلی لیتر خون فاقد هپارین را در میکروتیوب ریخته و به آن یک میلی لیتر بافر R اضافه می کنیم و خوب مخلوط می کنیم. سپس به مدت دو دقیقه با شدت ۱۰۰۰ دور در دقیقه آنرا سانتریفوژ می کنیم. بعد محلول رویی که حاوی گلبولهای قرمز لیزشده و پلاسمای خون می باشد را دور ریخته و مجدداً حدود ۲۰۰ میکرو لیتر بافر R به میکروتیوب اضافه کرده و هم می زنیم تا رسوب موجود در میکروتیوب به رنگ سفید در آید و مجدداً با شدت۱۰۰۰دور در دقیقه سانتریفوژ می کنیم. این عمل را تا تهیه رسوب کاملاً سفید ادامه می دهیم. در مرحله بعد ۱۰۰ میکرولیتر محلول هیدروکسید سدیم (NaOH) 50 میلی مولار بر روی رسوب ریخته و آنقدر هم می زنیم تا

رسوب حل شود. سپس میکرو تیوبها را به مدت ۲۰ دقیقـــه در آب جـــوش قـــرار داده تا گلبولهای سفید لیز شوند. در آخرین مرحله ۲۰ میکـرولـیتر Tris یک مولار را بـه میکروتیوپ اضافه می کنیـــم. (ایـــن محلول باعث نگهداری و حفاظت DNA در محلول می شود) و هم می زنیم و سپس به مدت ۳۰-۲۰ ثانیه با دور ۱۰۰۰ سانتریفوژ می کنیم و در نهایت محلول رویی که حاوی DNA می باشد با احتیاط به یک میکروتیوپ جدید منتقل می کنیم. سپس با اتانل مطلق DNA را رسوب می دهیم.

روش جوشاندن دارای معایب و محاسن متعددی است. این روش اصولاً دارای مرحله ای تحت عنوان خالص سازی نمی باشد ، بلکه توانایی آن تنها از این نظر مهم میباشد که میتواند DNA را در دسترس قرار دهد. علاوه بر این مواد مصرفی در این روش کمتر بوده و در زمان کوتاه امکان کار با نمونه های انبوه وجود داشته و آلودگی در آزمایشگاه نیز کمتر خواهد بود. از معایب این روش هم عدم حذف کامل مهار کننده ها می باشد و دیگر اینکه روش جوشاندن قادر به استفاده نمونه های با مقادیر کم DNA نمی باشد. با وجود معایب متعدد آن بواسطه سرعت مطلوب این روش در بسیاری از آزمایشگاههای تشخیص طبی که از PCR استفاده می گردد برای آماده نمودن DNA از آن استفاده می نمایند. با استفاده ازاین روش می توان به آسانی از خون تازه ، لخته شده ، کهنه و خشک و همچنین عوامل بیماریزا DNA را استخراج کرد.

ارزیابی کمی و کیفی DNAی استخراج شده:

۱- روش اسپکتروفتومتری:

به منظور ارزیابی کیفی DNA از روش ژل الکتروفورز و جهت ارزیابی کمی DNA و آگاهی از میزان غلظت و خلوص آن می توان از روش اسپکتروفتومتری استفاده کرد و بهتر است از دستگاه "پیکودراپ" یا "نانو دراپ" استفاده شود. در این قسمت روش ساده و دقیق اسپکتروفتومتری که در آن، میزان جذب اشعه UV توسط بازهای DNA اندازه گرفته می شود بررسی می گردد. مولکول های DNA به علت حضور بازهای آروماتیک آدنین، تیمین، سیتوزین و گوانین دارای جذب نوری زیاد در محدودهٔ ماوراء بنفش می باشند. بنابراین اندازه گیری جذب نوری محلول های DNA شاخص خوبی برای درجه خلوص آن می باشد.

حداکثر جذب مولکولDNA در طول موج ۲۶۰nm است. از طرفی معمولاً محلول های DNA مقداری آلودگی پروتئینی دارند که حداکثر جذب محلول های پروتئینی نیز به علت حضور اسیدهای آروماتیک مانند تریپتوفان فنیل، تیروزین و آلانین در طول موج 280nm می‌باشد. جذب نوری معیار مناسبی برای تعیین نسبت DNA/Protein در یک نمونه و به عبارتی درجه خلوص خواهد بود. به همین علت جهت تعیین غلظت DNA محلول ، باید جذب آن را یکبار در طول موج ۲۶۰ نانومتر (طول موجی که در آن DNA حداکثر

جذب را دارد) و بار دیگر در طول موج ۲۸۰ نانومتر (که پروتئین حداکثر جذب را دارد) اندازه گرفت و با استفاده از نسبت جذب در ۲۶۰ نانومتر به جذب در ۲۸۰ نانومتر (260/280) مقدار ناخالصی را محاسبه کرد.

بنابراین برای تعیین کیفیت و میزان خالص بودن DNA نسبت دو جذب به صورت زیر محاسبه شده که این مقدار باید بین ۲–۱/۸ باشد:

نسبت جذب(A) = جذب در 260nm / جذب در280nm

A<۱/۸ ← غلظت پروتئین بالا است

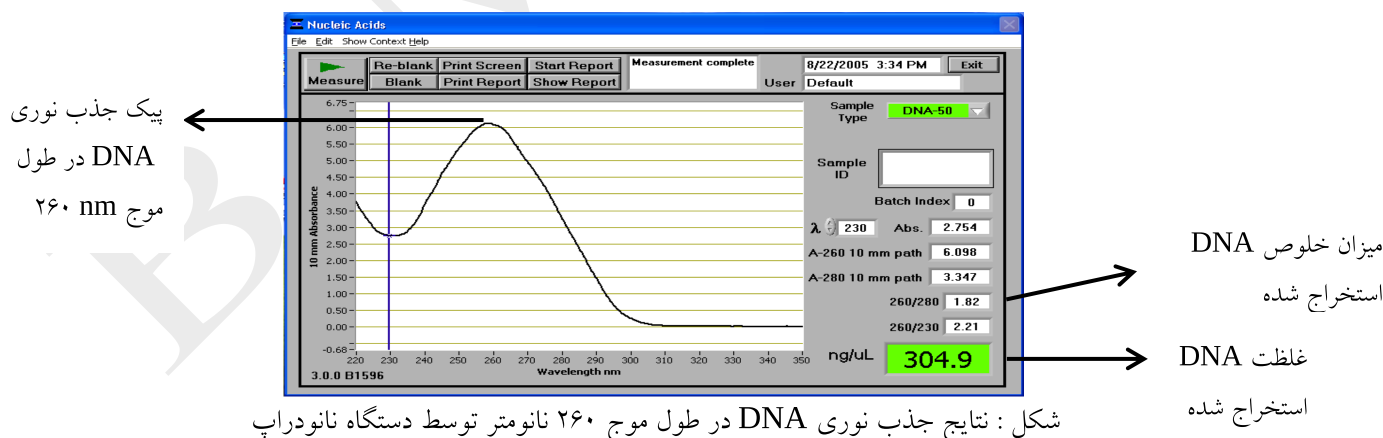
A>۲ ← غلظت RNA و نمکها بالا است

جهت انجام این کار از دستگاه اسپکتروفتومتر،نانودراپ و یا پیکودراپ استفاده می شود.



اسپکتروفتومتر　　　　نانودراپ　　　　پیکودراپ

نتایج از طریق نرم افزار مرتبط با دستگاه بر روی صفحه کامپیوتر به شکل زیر ظاهر می شود که پیک جذب نوری، میزان خلوص DNAی استخراج شده و غلظت DNAی استخراج شده را گزارش می کند.



شکل : نتایج جذب نوری DNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر توسط دستگاه نانودراپ

جهت بررسی کیفی DNAی استخراج شده می توان از ژل الکتروفورز نیز استفاده کرد که شرح آن در جلسات آینده ارائه خواهد شد.

آزمایش ۲

واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR: Polymerase Chain Reaction)

PCR یا واکنش زنجیره ای پلیمراز (Polymerase Chain Reaction)، تکنیکی است که با استفاده از آن می‌توان در مدت زمان کوتاهی قطعه خاصی از مولکول DNA را در شرایط آزمایشگاهی میلیون ها بار تکثیر نمود. این قطعه DNA ممکن است یک ژن، بخشی از یک کروموزوم یا بخش هایی از ژنوم یک موجود باشد. البته در تکثیر DNA با روش PCR محدودیتهایی نیز وجود دارد که مهمترین آنها اندازه قطعات قابل تکثیر می-باشد به طوری که حداکثر اندازه قطعه هایی که با روش PCR معمولی تکثیر می گردد، ۵ هزار نوکلئوتید (5 kb) و در روش های بهینه شده تا ۲۰ هزار نوکلئوتید (20kb) می باشد.

واکنش PCR درون یک میکروتیوب در دستگاهی تحت عنوان ترموسایکلر با برنامه تغییرات دمایی انجام می-گیرد.

اساس این روش بسیار ساده بوده و مانند واکنش همانندسازی DNA در موجودات زنده توسط آنزیم DNA پلیمراز صورت می گیرد. در موجودات زنده، مجموعه‌ای از چند پروتئین و آنزیم در فرآیند همانند سازی DNA نقش دارند در حالی که در واکنش PCR تنها نوع خاصی آنزیم DNA پلیمراز مقاوم به حرارت به نام Taq polymerase به همراه بافر، کلرید منیزیم (حاوی یون +Mg2) و نوکلئوتیدها (dNTPs) جهت تکثیر قطعات DNA استفاده می شود. همچنین این روش نیاز به یک DNAی الگو و نیز یک جفت توالی آغازگر به نام پرایمر (Primer) دارد.

در سال ۱۹۸۳، کَری مولیس (Kary Mullis) واکنش PCR را جهت تکثیر DNA اختراع کرد. قبل از این کشف، ساخت قطعات DNA با روشهای کند و پر هزینه شیمیایی انجام می‌گرفت. به دلیل اهمیت این اختراع، کاربردهای فراوان و نقش ارزنده آن در پیشرفت علم ژنتیک و زیست شناسی مولکولی، وی جایزه نوبل شیمی را در سال ۱۹۹۳ دریافت کرد. هنگامی که PCR فقط برای ردیابی یک قطعه DNAی ویژه به کار رود، این روش با عنوان PCR کیفی (qualitative PCR) خوانده می شود . این روش یک متد بسیار حساس است که به طور تئوریکی قادر به کشف یک مولکول منفرد DNA در یک محلول نمونه است. در این روش در بسیاری از موارد یک ژن ویژه کپی می گردد .

امروزه واکنش PCR در اکثر آزمایشگاههای تشخیصی و تحقیقاتی استفاده می‌شود و در موارد بسیاری مثل شناسایی و جداسازی ژنها، کلونینگ، طبقه بندی و شناسایی موجودات زنده، تشخیص بیماری های ژنتیکی و حتی پرونده های جنایی و تعیین هویت کاربرد دارد. در حال حاضر و نزدیک به ۳۰ سال پس از کشف PCR، این تکنیک جزء لاینفک تحقیقات ژنتیک مولکولی به شمار می رود.

اساس کار تکنیک PCR:

اساس واکنش PCR جهت تکثیر توالی DNA دو رشته‌ای، بر پایه پلیمریزاسیون با استفاده از تغییرات دمایی می‌باشد که برای انجام آن از دو قطعه تک رشته‌ای اسید نوکلئیک کوتاه (معمولاً بین ۱۷ تا ۲۴ نوکلئوتید) به نام پرایمر یا آغازگر استفاده می‌شود که پلیمریزاسیون از انتهای این پرایمرها صورت می‌گیرد. بنابراین در انجام PCR توالی قطعه مورد نظر و سرحدات آن باید شناخته شده باشد.

در ابتدا پیوندهای هیدروژنی دو رشته توالی DNA با حرارت (۹۴-۹۵ درجه سانتیگراد) شکسته و دو رشته از یکدیگر جدا می شوند.

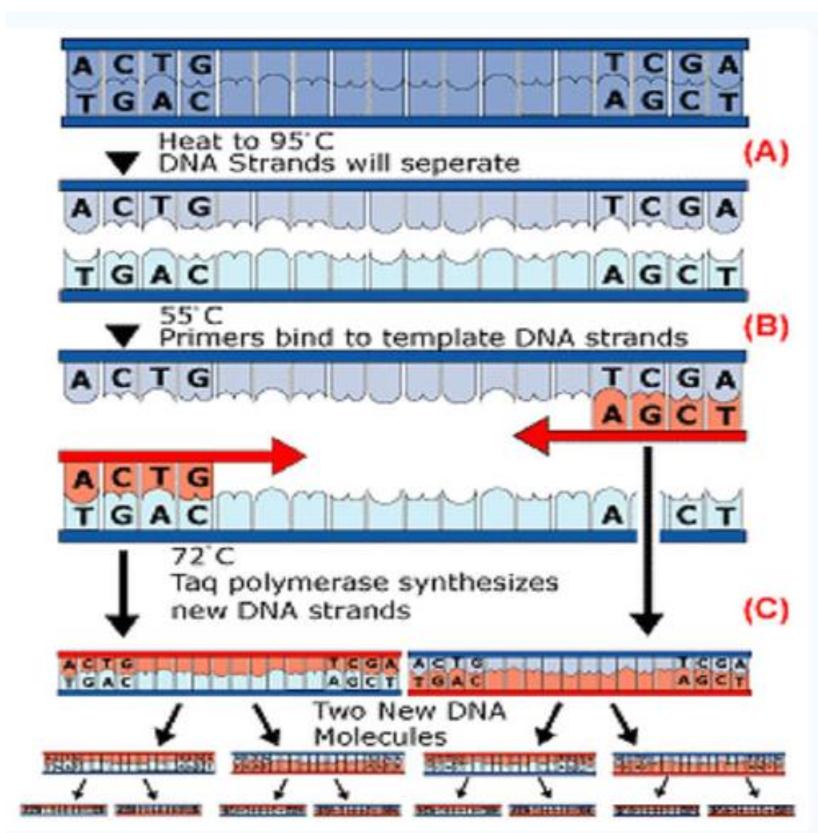
سپس دمای واکنش پایین آورده می شود (معمولاً ۵۵ تا ۶۵ درجه سانتیگراد). در این مرحله، دو قطعه کوتاه DNA تک رشته ای (پرایمر) که دقیقاً مشابه دو طرف قطعه DNA مورد نظر برای تکثیر، طراحی و ساخته شده‌اند، به توالیهای مکمل خود در دو رشته باز شده DNA متصل می‌گردند. یکی از این دو پرایمر به عنوان رفت (Forward) و دیگری به عنوان برگشت (Reverse) به کار گرفته می‌شوند. این دو پرایمر انتهای3’OH آزاد جهت فعالیت آنزیم DNA پلیمراز (Taq pol.) را فراهم می نماید، کاری که در همانندسازی به صورت invivo در موجودات زنده توسط آنزیم پریماز و توالی اولیه ساخته شده توسط آن انجام می گیرد. با این تفاوت که ماهیت پرایمر در invivo، RNA ای ولی در invitro ماهیت DNA ای دارد. در مرحله بعد، دمای واکنش تا ۷۲ درجه سانتیگراد (دمای مناسب آنزیم Taq polymerase) افزایش یافته و عمل تکثیر قطعه DNA مورد نظر بین دو پرایمر با استفاده از نوکلئوتیدهای موجود، توسط آنزیم Taq polymerase مقاوم به حرارت انجام می پذیرد.

سیکل های PCR:

تغییرات دمایی که به آنها اشاره شد به طور کلی شامل سه مرحله اصلی PCR می باشد که طی ۴۰-۲۵ سیکل (معمولا ۳۰ سیکل) انجام می گیرد و دستگاه PCR طبق برنامه وارد شده توسط کاربر این سه مرحله را به طور متوالی به تعداد سیکل های تعریف شده تکرار می‌کند. هر سیکل شامل مراحل زیر می‌باشد:

- **مرحله اول: (Denaturation step) یا مرحله واسرشت سازی،** ۳۰ تا ۶۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد که طی آن دو رشته DNA به وسیله حرارت از هم جدا می‌شوند.
- **مرحله دوم: (Annealing step) یا مرحله اتصال،** ۳۰ تا ۶۰ ثانیه در دمای ۶۵-۵۵ درجه سانتیگراد (بسته به نوع پرایمر)، در این مرحله با پایین آمدن دما پرایمرها به نواحی مکمل خود روی DNA الگو متصل شده و محدوده تکثیر قطعه DNA مشخص می‌شود. دمای این مرحله به میانگین Tm یا نقطه ذوب پرایمر بستگی دارد.

● **مرحله سوم: (Extension or Elongation step) یا مرحله طویل شدن یا گسترش،** ۶۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد انجام می گیرد که بهترین دما برای فعالیت آنزیم .Taq pol می‌باشد بنابراین شروع به سنتز از انتهای ۳'OH آزاد پرایمر می‌کند. پلیمریزاسیون در جهت ۳' ⟵ ۵' ادامه می‌یابد.



شکل ۱: واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR)

پس از اتمام سیکلها دو مرحله دیگر در پایان انجام می‌گیرد:

- مرحله Final Extension یا مرحله طویل شدن نهایی: که پس از اتمام آخرین سیکل به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد انجام می شود تا از همانندسازی کلیه تک رشته‌های DNA اطمینان حاصل گردد.
- مرحله Final Hold یا نگهداری نهایی که محصول PCR نهایی در دمای ۴ درجه سانتیگراد برای مدت زمان کوتاهی قابل نگهداری در دستگاه می‌باشد.

اجزاء واکنش PCR

<u>نمونه DNA (الگو) یا DNA Template :</u>

تکثیر از روی نمونه DNA ای که قبلا استخراج گردیده انجام می شود. معمولاً حدود یک میکروگرم از DNA ژنومی برای یک واکنش PCR کافی است. بیش از این مقدار، باعث تولید محصولات غیر اختصاصی (قطعات

DNA دیگری غیر از قطعه مورد نظر) شده و مقدار کم نمونه DNA نیز باعث کاهش دقت واکنش PCR یا عدم تکثیر قطعه مورد نظر می گردد. کیفیت نمونه DNA نیز مهم است به طوری که باقی ماندن ترکیبات مورد استفاده در مرحله استخراج DNA مثل فنل و EDTA، باعث کاهش فعالیت آنزیم Taq polymerase و عدم حصول نتیجه مورد نظر می گردد. همچنین آلوده شدن واکنش PCR با مقادیر بسیار اندک DNA از هر منبع دیگری، به دلیل حساسیت فوق العاده این تکنیک، ممکن است به تولید قطعات غیر قابل انتظار بیانجامد.

- **آنزیم Taq polymerase** :

DNA پلیمراز مورد استفاده در PCR، taq polymerase می‌باشد که از باکتری ترموس آکوآنتیکوس (Thermus aquanticus) استخراج شده و مقاوم به حرارت می باشد. این آنزیم برای تکثیر قطعات کمتر از سه هزار جفت باز توصیه شده و پر مصرف ترین آنزیم مورد استفاده در PCR می باشد. به طور معمول حدود یک واحد از این آنزیم در ۵۰ میکرو لیتر از واکنش PCR استفاده می شود. اگر نمونه DNA حاوی مواد ممانعت کننده PCR باشد، می‌توان این مقدار را دو تا سه برابر افزایش داد ولی مقادیر بالاتر آنزیم باعث تولید محصولات غیر اختصاصی می گردد. گرچه دمای مناسب برای این آنزیم ۷۲ درجه سانتیگراد می‌باشد ولی چون این آنزیم در دمای معمولی نیز قادر به تکثیر می باشد برای جلوگیری از اتصال قطعات پرایمر به نقاط دیگری روی توالی نمونه DNA و امکان تولید قطعات غیر اختصاصی، توصیه می شود که تمامی مراحل آماده سازی واکنش PCR بر روی یخ صورت گیرد.

- **نوکلئوتید ها (dNTPs)** :

چهار نوکلئوتید تشکیل دهنده قطعه DNA از اجزا واکنش PCR می‌باشند که به عنوان واحد های ساختمانی مورد نیاز در ساخت قطعه DNA استفاده می شوند. غلظت مورد نیاز از هر یک از نوکلئوتیدها برای واکنش PCR یکسان و برابر ۰/۲ میلی مولار می باشد. برای این منظور از مخلوط های آماده واجد هر چهار نوکلئوتید که با غلظت های مختلف مثل دو میلی مولار، ۱۰ میلی مولار و ۲۵ میلی مولار موجود است، استفاده می شود. به طور مثال، در یک واکنش ۵۰ میکرو لیتری PCR باید ۱ میکرو لیتر از مخلوط ۱۰میلی مولار نوکلئوتیدها برای دستیابی به مقدار مورد نیاز در واکنش استفاده کرد.

- **بافر** :

مهمترین نقش بافر PCR تنظیم pH مناسب واکنش PCR و آنزیم Taq polymerase می باشد. یکی از بافرهای رایج Tris-HCl است که یک بافر یونی دو قطبی می باشد.

- **یون Mg^{2+}** :

انواع مختلف آنزیم DNA polymerase برای فعالیت خود به این یون نیاز دارند و این یون برای اتصال پرایمر و قطعه DNA لازم است. برای تکثیر با Taq polymerase این یون عمدتاً به صورت ترکیب $MgCl_2$ در واکنش PCR استفاده می شود. این ترکیب گاهی در همان بافر PCR قرار داده می شود ولی از آنجا که برای برخی واکنش های

PCR لازم است که غلظت این یون تغییر نماید، این ترکیب به طور جداگانه تهیه و به واکنش PCR افزوده می‌شود. غلظت بهینه یون منیزیم در واکنش PCR، ۱/۵ میلی مولار است در حالیکه غلظت stock این یون ۵۰ میلی‌مولار است در نتیجه جهت استفاده در یک واکنش ۵۰ مایکرولیتری باید ۱/۵ مایکرولیتر از این ترکیب به سایر مواد افزوده شود . غلظت بالاتر از این مقدار باعث تکثیر قطعاتی غیر از قطعه مورد نظر (قطعات غیر اختصاصی) شده و غلظت پایین این یون نیز ممکن است به کاهش کارایی واکنش و میزان تولید قطعه مورد نظر منجر شود.

- **پرایمر یا آغاز گر (Primers)** :

برای انجام PCR نیاز به دو پرایمر Forward (رفت) و Reverse (برگشت) است. پرایمرها در حالت invivo از جنس RNA هستند چرا که تمامی آنزیم های DNA pol برای سنتز نیاز به انتهای ۳'oH دارند اما RNA pol ها بدون نیاز به آن می‌توانند از روی الگوی DNA رشته RNA سنتز کنند به همین خاطر برای شروع همانند سازی ابتدا RNA pol ها یک قطعه کوچک سنتز می‌کنند (پرایمر) تا انتهای۳'oH آزاد برای فعالیت آنزیم های DNA pol ایجاد شود طبیعتاً محصول RNA pol ها مولکول RNA خواهد بود. در حالیکه در حالت invitro باید از جنس DNA می باشند زیرا اگر از جنس RNA باشند به خاطر گروه OH فعال، سریعاً خاصیت خود را از دست می دهند.همچنین در فرایند PCR که همانندسازی به صورت invitro انجام می شود نیازی به آنزیم RNA پلیمراز جهت سنتز پرایمر RNA ای نیست چرا که ما با دانستن توالی قطعه مورد نظر، خودمان پرایمر را با ماهیت DNA ای طراحی می کنیم تا انتهای ۳'OH را جهت فعالیت DNA پلیمراز فراهم سازد. غلظت بهینه پرایمرها برای واکنش PCR از ۱۰۰ نانو مولار تا یک میکرو مولار متغییر است. غلظت بیش از این، منجر به تولید قطعات غیر اختصاصی می شود. طراحی پرایمر نیازمند دقت فراوانی است و مرحله بسیار مهمی در امکان پذیر شدن و صحت تکثیر قطعه مورد نظر دارد.طراحی پرایمر معمولاً به کمک نرم افزارهایی مثل Gene Runner ، Primer 3 و... انجام می‌شود. دمای مرحله اتصال در برنامه PCR به توالی پرایمرها ارتباط دارد و معمولا باید بین ۶۵-۵۰ درجه سانتیگراد باشد.

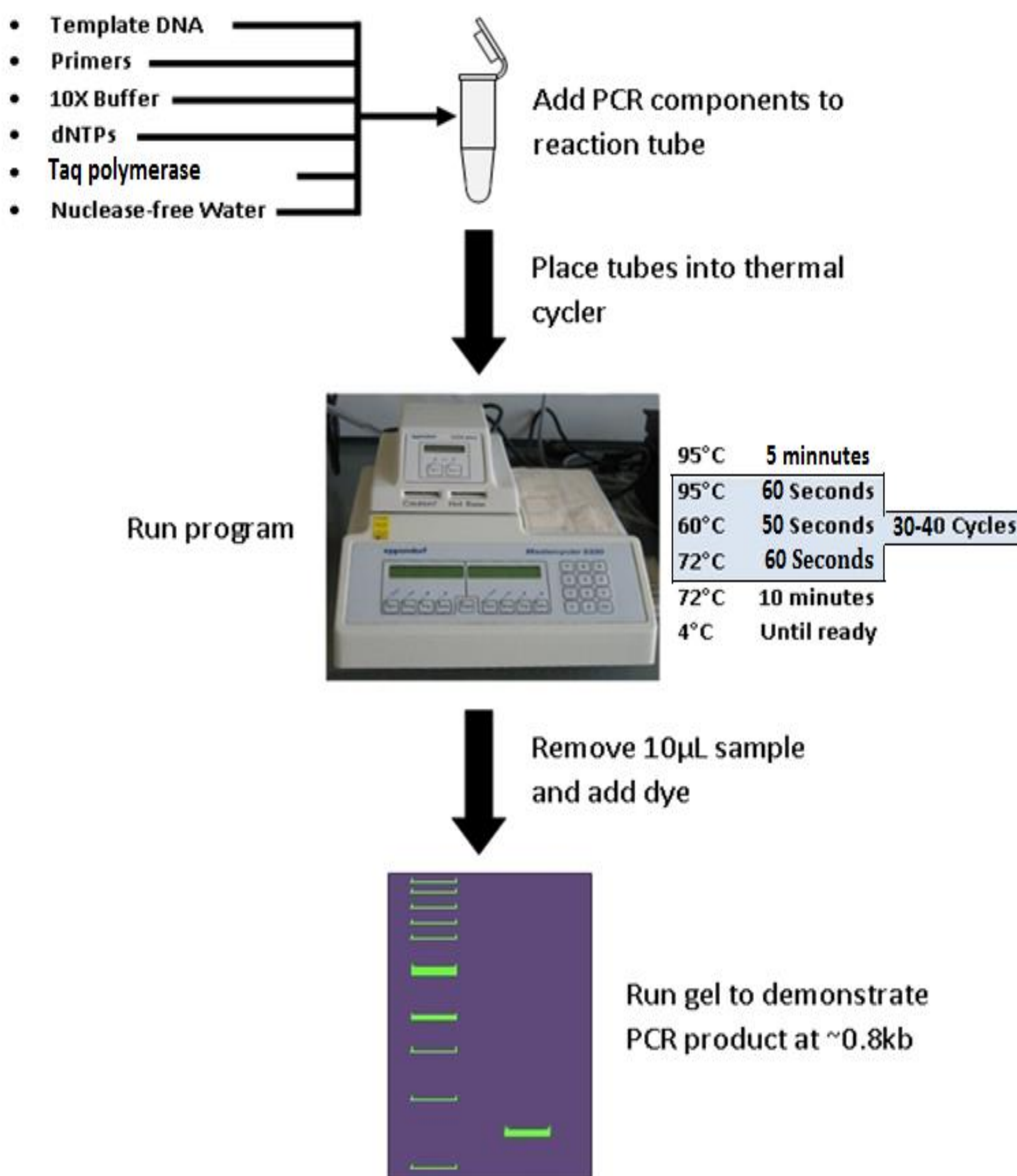
- ❖ کلیه این مواد به همراه آب مقطر در یک حجم ۲۵ مایکرولیتری و یا ۵۰ مایکرولیتری آماده می شوند. جهت محاسبه میزان آب، مقدار مصرفی از هریک از اجزاء در یک واکنش را جمع کرده و از حجم نهایی واکنش (۲۵ یا ۵۰ مایکرولیتر) کم کرده میزان آب مصرفی در یک واکنش به دست می آید.

وسایل مورد نیاز برای واکنش PCR :

۱. دستگاه ترموسایکلر (ایجاد کننده چرخه های دمایی که قابل برنامه ریزی می باشد)
۲. سمپلر (برای برداشتن مقادیر اندک مورد نیاز از مواد برای واکنش PCR در مقیاس میکرو لیتر)
۳. تیپ (قسمت پلاستیکی که برای کشیدن محلول به سمپلر متصل می شود)

۴. ویال یا میکروتیوب (لوله های درب دار کوچک، در دو اندازه بر اساس گنجایش آنها یعنی ۲۰۰ و ۵۰۰ میکرو لیتر، که واکنش PCR در آنها انجام می شود)
۵. ظروف نگهداری میکروتیوب ها (رک)
۶. یخ خشک

روش کار در آزمایشگاه ضمن انجام کار عملی به طور کامل شرح داده می شود که به طور خلاصه شامل موارد زیر است:



کاربردهای PCR :

تکنیک PCR کاربردهای نا محدودی در عرصه های مختلف زیست مولکولی دارد ، علت اصلی این امر این است که DNA الگوی بکار رفته در PCR را می توان از منابع مختلف تامین کرده و مورد استفاده قرار داد .

بطور کلی PCR به دو منظور اصلی بکار می رود :

۱- تهیه نسخه های متعدد از یک ژن :

برای این کار بجای اینکه هر دو پرایمر مورد نیاز برای PCR را به یک میزان به محیط واکنش اضافه کنند ، یکی از پرایمر ها را به تعداد کمتر پرایمر دیگر را به تعداد بیشتر اضافه می کنند . در هنگام انجام PCR ، در ابتدا هر دو رشته با هم همانند سازی می کنند ولی پس از تمام شدن یکی از پرایمر ها فقط رشته دیگر که هنوز پرایمر آن وجود دارد ساخته می شود و به همین دلیل نسخه های بیشتری از این رشته بوجود می آید. پس از پایان PCR چند نسخه DNA دو رشته ای از ژن مورد نظر ایجاد خواهد شد که می توان به طور مستقیم در روش سانجر بکار برد .

مثال دیگری از کاربردهای PCR بررسی پیوستگی ژنها و تعیین فاصله ی بین ژنها بر روی کروموزومهای انسان است . در ژنتیک برای تعیین فاصله ی بین ژنها از بررسی تعداد نوترکیبها به نسبت فنوتیپ والدین استفاده می شود . این روش برای مگس سرکه که زادآوری آن در هر نسل بسیار زیاد و دوره ی رشد آن نیز کوتاه است به راحتی قابل انجام است ولی در مورد انسان که زاده های آن در هر نسل بسیار محدود و با فاصله ی زمانی زیاد می باشد ، این بررسی هابه سختی و با محدودیت بسیار انجام می گیرد . ولی امروزه دانشمندان با استفاده از PCR روش جدیدی را برای این کار پیدا کرده اند . برای این کار از بررسی آللهای موجود در یک اسپرم استفاده می شود . از آنجائیکه اسپرمها هاپلوئید بوده و در هر اسپرم از هر کروموزوم یک عدد وجود دارد ، با بررسی همزمان دو ژن بر روی یک کروموزوم و تعیین میزان نوترکیبی بین این دو ژن می توان فاصله ی ژنتیکی بین دو ژن را تعیین کرد . در واقع از نظر ژنتیکی بررسی ۱۰۰۰ اسپرم با بررسی ۱۰۰۰ فرزند یک خانواده برابر است . با استفاده از این روش ثابت شده است که میزان نوترکیبی کروموزومها در مردها با میزان نوترکیبی در زنها متفاوت است .

۲- بررسی حضور یا عدم حضور یک ژن خاص در مخلوطی از DNA :

به جرأت می توان گفت که این کاربرد دوم PCR مهمترین کاربرد آن و علت اصلی گسترش روزافزون آن در کلیه شاخه‌های علوم زیست مولکولی است. تعدادی از این کاربردها عبارتند از :

- تشخیص قبل از تولد بیماریهای ژنتیکی
- تعیین جنسیت جنین
- بررسی عفونت های باکتریایی و ویروسی
- تشخیص جهش ها و سرطان ها :

- تعیین توالیهای کروموزومی انسان در سلولهای هیبریدی (هتروکاریونها)

مشکلات PCR :

با تمامی مزیتهای فوق PCR مشکلات خاص خود را دارد . مهمترین مشکل PCR آلودگی نمونه های مورد بررسی است . به دلیل حساسیت فوق العاده و قدرت تکثیر زیاد PCR هر قطعه DNA خارجی که وارد محیط PCR شود ، مورد تکثیر قرار گرفته و نتایج عجیب و دور از واقعیتی به وجود خواهد آورد . برای مثال در مورد تحقیقی که در تعیین جنسیت با استفاده از خون مادران باردار بیان شد ، در بین جوابها یک مورد مثبت کاذب برای یکی از زنان غیر باردار که به عنوان شاهد منفی استفاده شده بود ، وجود داشت . پس از بررسی معلوم شد که تعداد ناچیزی از سلولهای پوست یکی از کارکنان مرد آزمایشگاه وارد لوله ی PCR شده است . گاهی نیز باقیمانده ی قطعات DNA حاصل از تکثیر DNA های قبلی باعث آلودگی PCR می شود که در این مورد شستشوی زیاد و دقیق مشکل گشا است .

طراحی پرایمر:

نکات مهم در طراحی پرایمر:

- ۲۴-۱۷ نوکلئوتید طول داشته باشد ، تا بتواند ویژگی کافی برای اتصال به توالی هدف منحصر به فرد را حتی در مورد الگوهای اولیه، به DNA ژنومی پیچیده‌ی انسان فراهم کند. اگر طول پرایمر از این مقدار کمتر باشد علاوه بر اینکه اختصاصیت پرایمر را کاهش می دهد، اتصال پرایمر به هدف را نیز سست می- کند و اگر طول پرایمر از این مقدار بیشتر باشد اتصال پرایمر دشوار خواهد شد و مدت زمان بیشتری لازم خواهد بود تا پرایمر به هدف متصل شود که این زمان خارج از مدت زمان تعیین شده برای PCR شده و غیرممکن خواهد بود.
- توالی پرایمرها دارای پراکندگی مناسبی از چهار نوکلئوتید باشد.
- درصد GC پرایمرها بین ۵۰ تا ۶۰ باشد.
- از توالی های تکراری یا نواحی حاوی ردیفی از یک نوکلئوتید خودداری شود، زیرا این امرمی‌تواند منجر به لغزش (Slipping) پرایمرها به روی الگو شود.
- باید از انتخاب تکرارهای معکوس یا پالیندرومیک یا هر توالی خود مکمل بیشتر از ۳ جفت باز پرهیز نمود تا امکان تشکیل ساختارهای ثانویه به دلیل مکمل بودن توالی‌های داخلی، وجود نداشته باشد.
- صحت توالی های انتهای ´۳ برای تکثیر ضروری است بنابراین باید دقت کرد که منطقه مورد نظر دارای پلی مورفیسم نباشد.
- از تکرار سه یا بیشتر C و G در انتهای ´۳ خودداری شود زیرا ممکن است منجر به اتصال غلط در نواحی غنی از GC گردد.
- به طور کلی حداقل سه نوکلئوتید آخر انتهای ´۳ باید کاملاً با توالی الگو جفت شوند زیرا ناحیه ای از پرایمر که باید کاملاً با الگو مطابقت داشته باشد انتهای ´۳ است زیرا این انتهای پرایمر بوسیلهٔ DNA پلی مراز گسترش می‌یابد وبنابراین برای اطمینان از ویژگی اتصال به توالی هدف اهمیت دارد.
- توالی های انتهای ´۳ امکان اتصال با خود و یا با هر پرایمر دیگر که ممکن است در PCR با آنها همراه شود را نداشته باشند، درغیر اینصورت پرایمرها تشکیل پرایمر دایمر می‌دهند.

"پرایمر دایمر" حاصل طویل شدن پرایمر به وسیلهٔ پلی مراز با الگو گرفتن از خود پرایمر یا پرایمر دیگر PCR است با توجه به اینکه محصول پرایمر دایمر محتوی یک یا هردو پرایمر و توالی مکمل آنهاست، این محصول یک الگوی عالی برای تکثیرهای بعدی است. از آنجائیکه محصولات کوچکتر با بازده بهتری تکثیر می‌شوند (و پرایمر- دایمر کوچکترین اندازه را داراست) لذا این محصولات

می‌توانند بخش غالب PCR را در برگرفته و پرایمرها را از اتصال به توالی هدف خود بر روی DNA الگو باز دارند.

- دمای ذوب (Tm) دو پرایمر نباید بیشتر از ۵°C باشد.

TM دمایی است که در آن نیمی‌از پرایمرها به توالی هدف متصل شده اند. روش های مختلفی برای محاسبهٔ TM وجود دارد. ساده ترین روش برای پرایمرها با طول حدود ۲۰ نوکلئوتید، جمع کردن تعداد هریک از نوکلئوتیدها در پرایمر و سپس استفاده ازرابطه زیر است:

TM= [4°C(G+C) + 2 °C (A + T تعداد)]

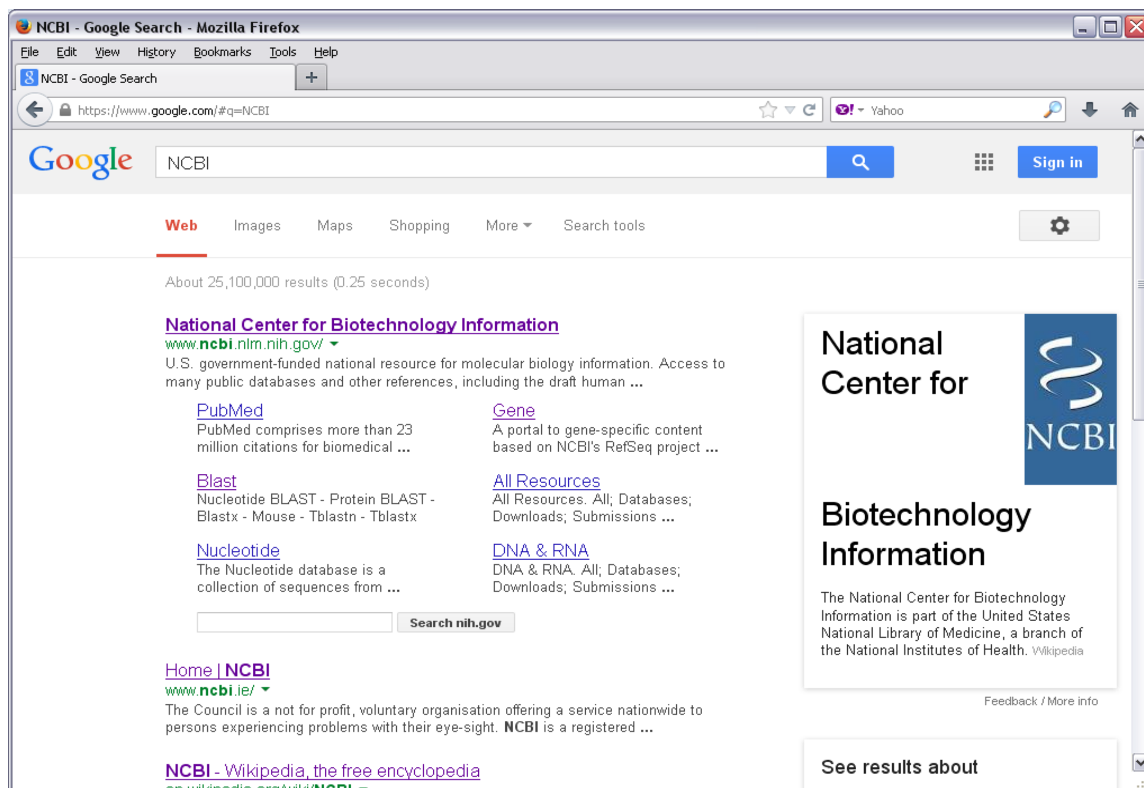
این رابطه نشان می‌دهد که جفت بازهای G/C به دلیل دارا بودن تعداد پیوندهای هیدروژنی بیشتر، از جفت بازهای A/T پایدارترند. مهمترین کاربرد این رابطه هنگام طراحی پرایمرها برای یکی کردنTM آنهاست تا دمای اتصال آنها، باهم برابر باشد. به طور مثال واضح است که استفاده از یک پرایمر با TM= ۴۰ °C همراه با پرایمر دیگری با TM= ۶۸°C صحیح نیست. در صورت استفاده ازرابطه فوق برای محاسبه TM، بهتر است که دمای اتصال در اولین PCR درحدود ۵-۳°c پائین تر از TM محاسبه شده تنظیم گردد.

درعمل اغلب لازم است که دمای اتصال به صورتی تجربی تعیین گردد. مطلوب ترین حالت، استفاده از بالاترین دمائی است که در آن تکثیر کافی محصول مورد نظر با حداقل محصولات غیراختصاصی امکان پذیر باشد. بهینه سازی دمای اتصال در صورتی که بتوان از یک ترموسایکلر دارای بلوک شیب حرارتی (gradient) استفاده نمود، بسیار راحت خواهد بود.

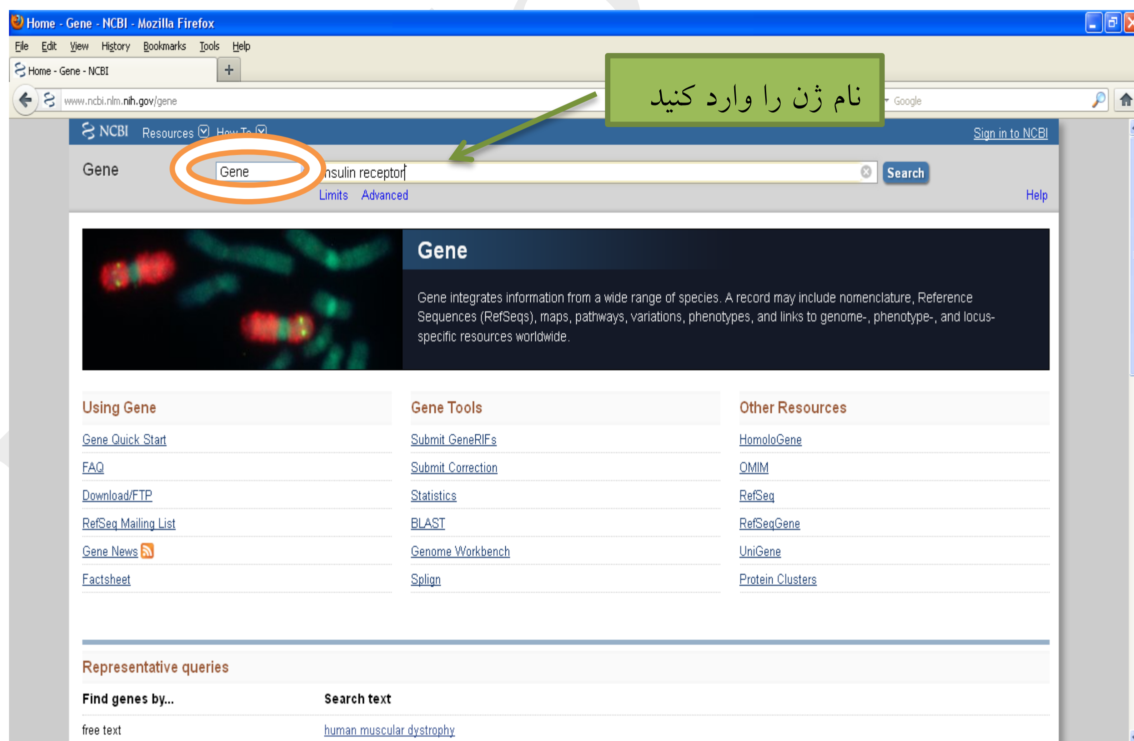
به منظور طراحی پرایمر برای یک قطعه خاص، ابتدا لازم است اطلاعات مربوط به ژن مورد نظر و یا اگزون مربوطه را با کمک سایت‌های Genome Browser مثل NCBI، UCSC و .... جستجو کنید. این پایگاه‌ها در یک مسیر کاملاً سازماندهی شده مقادیر قابل توجهی از اطلاعات توالی‌های نوکلئوتیدی که در آزمایشگاههای مختلف تولید می شود را جمع آوری کرده و ذخیره می کنند. هر پایگاه اطلاعاتی، قالب خاص خود را داشته و روش جستجو در آن نیز در عین سادگی از اختصاصیت برخوردار است. در جهان سه پایگاه اصلی برای حفظ، ذخیره و بازیابی اطلاعات نوکلئوتیدی وجود دارد که به طور روزانه داده های جدید خود را مبادله می کنند. که پر کاربردترین آن پایگاه GeneBank در امریکای شمالی است که توسط مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI) سرپرستی می شود.

چگونگی جستجو در پایگاه اطلاعات NCBI:

ابتدا NCBI را از طریق موتور جستجو google جستجو کرده سپس گزینه GENE را انتخاب کنید. سپس نام ژن مورد نظر را در ریبون نمایش داده شده تایپ کنید. چندین مورد نمایش داده می شود اگر ژن مورد نظر شما مربوط به انسان است گونه human یا homosapiense را انتخاب کنید. آنگاه می توانید اطلاعات مربوط به ژن مورد نظر را مشاهده کنید.



NCBI - Google Search - Mozilla Firefox
File Edit View History Bookmarks Tools Help
NCBI - Google Search
https://www.google.com/#q=NCBI
Yahoo
Google
NCBI
Sign in
Web Images Maps Shopping More Search tools
About 25,100,000 results (0.25 seconds)
National Center for Biotechnology Information
www.ncbi.nlm.nih.gov/
U.S. government-funded national resource for molecular biology information. Access to many public databases and other references, including the draft human ...
PubMed
PubMed comprises more than 23 million citations for biomedical ...
Gene
A portal to gene-specific content based on NCBI's RefSeq project ...
Blast
Nucleotide BLAST - Protein BLAST - Blastx - Mouse - Tblastn - Tblastx
All Resources
All Resources. All; Databases; Downloads; Submissions ...
Nucleotide
The Nucleotide database is a collection of sequences from ...
DNA & RNA
DNA & RNA. All; Databases; Downloads; Submissions ...
Search nih.gov
Home | NCBI
www.ncbi.ie/
The Council is a not for profit, voluntary organisation offering a service nationwide to persons experiencing problems with their eye-sight. NCBI is a registered ...
NCBI - Wikipedia, the free encyclopedia
National Center for Biotechnology Information
NCBI
The National Center for Biotechnology Information is part of the United States National Library of Medicine, a branch of the National Institutes of Health. Wikipedia
Feedback / More info
See results about



Home - Gene - NCBI - Mozilla Firefox
File Edit View History Bookmarks Tools Help
Home - Gene - NCBI
www.ncbi.nlm.nih.gov/gene
نام ژن را وارد کنید
NCBI Resources How To
Sign in to NCBI
Gene
Gene
insulin receptor
Search
Limits Advanced
Help
Gene
Gene integrates information from a wide range of species. A record may include nomenclature, Reference Sequences (RefSeqs), maps, pathways, variations, phenotypes, and links to genome-, phenotype-, and locus-specific resources worldwide.
Using Gene
Gene Quick Start
FAQ
Download/FTP
RefSeq Mailing List
Gene News
Factsheet
Gene Tools
Submit GeneRIFs
Submit Correction
Statistics
BLAST
Genome Workbench
Splign
Other Resources
HomoloGene
OMIM
RefSeq
RefSeqGene
UniGene
Protein Clusters
Representative queries
Find genes by...
Search text
free text
human muscular dystrophy

insulin receptor - Gene - NCBI - Mozilla Firefox

File Edit View History Bookmarks Tools Help

insulin receptor - Gene - NCBI

www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=insulin+receptor

NCBI Resources How To Sign in to NCBI

Gene | Gene | insulin receptor | Search

Save search Limits Advanced Help

گونه انسان را

انتخاب کنید

Display Settings: Summary, 20 per page, Sorted by Relevance

Results: 1 to 20 of 1495

1. IRS1 – insulin receptor substrate 1 [Homo sapiens (human)]
insulin receptor substrate 1
Official Symbol: IRS1
Other Aliases: HIRS-1
Other Designations: IRS-1
Location: 2q36
Annotation: Chromosome 2, NC_000002.11 (227596033..227664545, complement)
MIM: 147545
ID: 3667
Order cDNA clone

2. Irs1 – insulin receptor substrate 1 [Mus musculus (house mouse)]
insulin receptor substrate 1
Official Symbol: Irs1
Other Aliases: G972R, IRS-1
Location: 1 42.0 cM
Annotation: Chromosome 1, NC_000067.6 (82233105..82291439, complement)
ID: 16367
Order cDNA clone

3. INSR – insulin receptor [Homo sapiens (human)]
insulin receptor
Official Symbol: INSR

Filter your results:
All (1495)
Current Only (1433)
Genes Genomes (1405)
SNP GeneView (636)
In ClinVar (263)
Manage Filters

Top Organisms [Tree]
More...

Find related data
Database: Select
Find items

Search details
insulin receptor[All Fields]

INSRR insulin receptor-related receptor [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI - Mozilla Firefox

File Edit View History Bookmarks Tools Help

www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3645

NCBI Resources How To Sign in to NCBI

Gene | Gene | Search

Limits Advanced Help

اطلاعات مربوط

به ژن را مشاهده

می کنید

Display Settings: Full Report

INSRR insulin receptor-related receptor [*Homo sapiens* (human)]

Gene ID: 3645, updated on 3-Nov-2013

Summary

Official Symbol	INSRR provided by HGNC
Official Full Name	insulin receptor-related receptor provided by HGNC
Primary source	HGNC:6093
See related	Ensembl:ENSG00000027644; HPRD:00976; MIM:147671; Vega:OTTHUMG00000041291
Gene type	protein coding
RefSeq status	VALIDATED
Organism	Homo sapiens
Lineage	Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo
Also known as	IRR

Genomic context

See INSRR in Epigenomics, MapViewer

Location: 1q21-q23
Sequence: Chromosome: 1; NC_000001.10 (156810665..156828712, complement)

Chromosome 1 - NC_000001.10

..., and products
Interactions
Pathways
General gene information
Markers, Homology, Gene Ontology
General protein information
Reference sequences
Related sequences
Additional links

Related information
Order cDNA clone
BioAssay
BioAssay by Target (List)
BioAssay by Target (Summary)

برای گرفتن توالی ژن مورد نظر هم می توان از قسمت Gen Bank وارد شد ویا اینکه با فرمت FASTA توالی ژن را به دست آورد.

اجزای یک رکورد GenBank:

۱-بخش عنوان یا Header:

این بخش از رکورد حاوی اطلاعاتی نظیر نام لوکوس (که گاهی همان شماره دسترسی است)، نوع مولکول، زمان تسلیم اطلاعات، تعریف حاوی نام توالی، شماره دسترسی، شماره نسخه (شماره دسترسی باضافه یک عدد برای نشان دادن دفعات اصلاح آن رکورد)، منشاء توالی و تاکسونومی موجود منشاء، کلید واژه‌ها و آدرس مقالات مربوط می‌باشد در شکل ۴ یک نمونه از یک رکورد به همراه توضیحات آمده است. شماره دسترسی مهمترین جزء این قسمت است زیرا تنها این شماره یگانه بوده و بهترین گزینه برای مراجعه مجدد به این رکورد می‌باشد.

شماره
دسترسي

GenBank Division

☐ 1: NM_000457. Homo sapiens hepa...[gi:21361184]

```
LOCUS       HNF4A                   2289 bp    mRNA    linear   PRI 27-AUG-2002
DEFINITION  Homo sapiens hepatocyte nuclear factor 4, alpha (HNF4A), mRNA.
ACCESSION   NM_000457
VERSION     NM_000457.2  GI:21361184
KEYWORDS    .
SOURCE      human.
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Cra... Vertebrata; Euteleostom...
            Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrh... Hominidae; Homo.
REFERENCE   1  (bases 1 to 2289)
  AUTHORS   Bell,G.I., Xiang,K.S., Newman,M.V., ...
            Fajans,S.S., Spielman,R.S. and Cox,N.J.
  TITLE     Gene for non-insulin-dependent diabetes mellitus (maturity-onset
            diabetes of the young subtype) is linked to DNA polymorphism on
            human chromosome 20q
  JOURNAL   Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88 (4), 1484-1488 (1991)
  MEDLINE   91142197
   PUBMED   1899928
REFERENCE   2  (bases 1 to 2289)
  AUTHORS   Chartier,F.L., Bossu,J.P., Laudet,V., Fruchart,J.C. and Laine,B.
  TITLE     Cloning and sequencing of cDNAs encoding the human hepatocyte
            nuclear factor 4 indicate the presence of two isoforms in human
            liver
  JOURNAL   Gene 147 (2), 269-272 (1994)
  MEDLINE   95011627
   PUBMED   7926813
REFERENCE   3  (bases 1 to 2289)
  AUTHORS   Drewes,T., Senkel,S., Holewa,B. and Ryffel,G.U.
```

زمان تسليم اطلا زمان تسليم
اطلاعات يا آخرين تغييرات
عات يا آخرين تغييرات

نام لوكوس

نوع مولكول

– بخش ویژگی‌ها یا Features:

در این بخش اطلاعاتی که در مورد ویژگی‌های توالی است نشان داده می شود. طول توالی، محل توالی رمزکننده پروتئین و اگزون‌ها (در صورت وجود)، گوناگونی در توالی (Variation)، توالی پروتئین رمز شده توسط آن توالی نوکلئوتیدی و مانند آنها در این بخش فهرست می‌شوند.نمونه این بخش را به همراه توضیحات جزئی در شکل مشاهده کنید.

```
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..2289
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /chromosome="20"
                     /map="20q12-q13.1"
                     /tissue_type="kidney"
                     /clone_lib="cDNA library"
     gene            1..2289
                     /gene="HNF4A"
                     /note="TCF; HNF4; MODY; MODY1; NR2A1; TCF14; NR2A21"
                     /db_xref="LocusID:3172"
                     /db_xref="MIM:600281"
 Link to Seq         complement(86)
                     /allele="C"
                     /allele="G"
                     /db_xref="dbSNP:1063240"
     CDS             104..1618
                     /gene="HNF4A"
                     /function="transcription factor"
                     /note="transcription factor-14; hepatic nuclear factor 4,
                     alpha"
                     /codon_start=1
                     /evidence=experimental
                     /product="hepatocyte nuclear factor 4, alpha"
                     /protein_id="NP_000448.2"
                     /db_xref="GI:21361185"
                     /db_xref="LocusID:3172"
                     /db_xref="MIM:600281"
                     /translation="MRLSKTLVDMDMADYSAALDPAYTTLEFENVQVLTMGNDLLPLR
                     LARLRHPLRHHWSISGGVDSSPQGDTSPSEGTNLNAPNSLGVSALCAICGDRATGKHY
                     GASSCDGCKGFFRRSVRKNHMYSCRFSRQCVVDKDKRNQCRYCRLKKCFRAGMKKEAV
                     QNERDRISTRRSSYEDSSLPSINALLQAEVLSRQITSPVSGINGDIRAKKIASIADVC
                     ESMKEQLLVLVEWAKYIPAFCELPLDDQVALLRAHAGEHLLLGATKRSMVFKDVLLLG
                     NDYIVPRHCPELAEMSRVSIRILDELVLPFQELQIDDNEYAYLKAIIFFDPDAKGLSD
                     PGKIKRLRSQVQVSLEDYINDRQYDSRGRFGELLLLLPTLQSITWQMIEQIQFIKLFG
                     MAKIDNLLQEMLLGGSPSDAPHAHHPLHPHLMQEHMGTNVIVANTMPTHLSNGQMCEW
```

۳-توالی یا Sequence:

با ارائه آماری از انواع باز های نوکلئوتیدی و پس از کلمه Origin توالی شروع می‌شود. اعداد در سمت چپ توالی موقعیت باز کنار آن در طول توالی را نشان می‌دهد. توالی ممکن است به کوچکی یک اولگیونوکلئوتید (بیش از ۲۰ جفت باز) در قسمت STS تا به بزرگی میلیون‌ها باز (توالی‌های کروموزم‌های به دست آمده از پروژه‌های ژنوم) باشد

```
BASE COUNT      489 a    723 c    653 g    424 t
ORIGIN
        1 gcagagaggg cactgggagg aggcagtggg agggcggagg gcgggggcct tcggggtggg
       61 cgcccagggt agggcaggtg gccgcggcgt ggaggcaggg agaatgcgac tctccaaaac
      121 cctcgtcgac atggacatgg ccgactacag tgctgcactg gacccagcct acaccaccct
      181 ggaatttgag aatgtgcagg tgttgacgat gggcaatgat ttgttgccgc tgcgtctcgc
      241 cagattgagg catcccctcc gacatcactg gagcatatct ggaggggtgg acagttctcc
      301 acagggagac acgtccccat cagaaggcac caacctcaac gcgcccaaca gcctgggtgt
      361 cagcgccctg tgtgccatct gcggggaccg ggccacgggc aaacactacg gtgcctcgag
      421 ctgtgacggc tgcaagggct tcttccggag gagcgtgcgg aagaaccaca tgtactcctg
      481 cagatttagc cggcagtgcg tggtggacaa agacaagagg aaccagtgcc gctactgcag
      541 gctcaagaaa tgcttccggg ctggcatgaa gaaggaagcc gtccagaatg agcgggaccg
      601 gatcagcact cgaaggtcaa gctatgagga cagcagcctg ccctccatca atgcgctcct
      661 gcaggcggag gtcctgtccc gacagatcac ctcccccgtc tccgggatca acggcgacat
      721 tcgggcgaag aagattgcca gcatcgcaga tgtgtgtgag tccatgaagg agcagctgct
```

قالب (Formats) نمایش توالی FASTA :

پس از جستجو، می‌توانید رکورد یا توالی مورد نظر را به اشکال مختلف نمایش دهید. این موضوع هنگامی اهمیت می‌یابد که می‌خواهید تجزیه و تحلیل بیشتر روی توالی به دست آمده با استفاده از نرم‌افزارهای دیگر انجام دهید. اکثر نرم‌افزارها قالب FASTA را می‌پذیرند. در این قالب، سطر اول با علامت < آغاز شده و یک متن حاوی نام توال به دنبال آن می‌آید. سطرهای بعدی فقط توالی هستند (شکل زیر).

NCBI Entrez Nucleotide

Entrez | PubMed | Nucleotide | Protein | Genome | Structure | PMC | Taxonomy | Books

Search Nucleotide for [ ] Go Clear

Limits | Preview/Index | History | Clipboard | Details

Display [default] Show: 20 Send to [File] Get Subsequence Features

ASN.1
Summary
FASTA
TinySeq XML
GenBank
GBSeq XML
GI List
Graphics
XML
default

☐ 1: NM_0... piens tumo...[gi:8400737] Links

```
LOCUS                           2629 bp    mRNA    linear   PRI 20-DEC-2003
DEFINITION                   s tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome) (TP53), mRNA.
ACCESSION
VERSION                        GI:8400737
KEYWORDS
SOURCE                       s (human)
  ORGANISM                   s
                        Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
            Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1  (bases 1 to 2629)
  AUTHORS   Itoh,T., O'Shea,C. and Linn,S.
  TITLE     Impaired regulation of tumor suppressor p53 caused by mutations in
            the xeroderma pigmentosum DDB2 gene: mutual regulatory interactions
```

قالب FASTA توالی

Entrez | PubMed | Nucleotide | Protein | Genome | Structure | PMC | Taxonomy | Books

Search Nucleotide for [ ] Go Clear

Limits | Preview/Index | History | Clipboard | Details

Display [FASTA] Show 20 Send to [File] Get Subsequence

☐ 1: NM_000546. Homo sapiens tumo...[gi:8400737] Links

```
>gi|8400737|ref|NM_000546.2| Homo sapiens tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome) (TP53), mRNA
ACTTGTCATGGCGACTGTCCA[illegible]
TCCCATGTGCTCAAGACTGGCGCTAAAAGTTTTGAGCTTCTCAAAAGTCTAGAGCCACCGTCCAGGGAGC
AGGTAGCTGCTGGGCTCCGGGGACACTTTGCGTTCGGGCTGGGAGCGTGCTTTCCACGACGGTGACACGC
TTCCCTGGATTGGCAGCCAGACTGCCTTCCGGGTCACTGCCATGGAGGAGCCGCAGTCAGATCCTAGCGT
CGAGCCCCCTCTGAGTCAGGAAACATTTTCAGACCTATGGAAACTACTTCCTGAAAACAACGTTCTGTCC
CCCTTGCCGTCCCAAGCAATGGATGATTTGATGCTGTCCCCGGACGATATTGAACAATGGTTCACTGAAG
ACCCAGGTCCAGATGAAGCTCCCAGAATGCCAGAGGCTGCTCCCCGCGTGGCCCCTGCACCAGCAGCTCC
TACACCGGCGGCCCCTGCACCAGCCCCCTCCTGGCCCCTGTCATCTTCTGTCCCTTCCCAGAAAACCTAC
CAGGGCAGCTACGGTTTCCGTCTGGGCTTCTTGCATTCTGGGACAGCCAAGTCTGTGACTTGCACGTACT
CCCCTGCCCTCAACAAGATGTTTTGCCAACTGGCCAAGACCTGCCCTGTGCAGCTGTGGGTTGATTCCAC
ACCCCCGCCCGGCACCCGCGTCCGCGCCATGGCCATCTACAAGCAGTCACAGCACATGACGGAGGTTGTG
AGGCGCTGCCCCCACCATGAGCGCTGCTCAGATAGCGATGGTCTGGCCCCTCCTCAGCATCTTATCCGAG
TGGAAGGAAATTTGCGTGTGGAGTATTTGGATGACAGAAACACTTTTCGACATAGTGTGGTGGTGCCCTA
TGAGCCGCCTGAGGTTGGCTCTGACTGTACCACCATCCACTACAACTACATGTGTAACAGTTCCTGCATG
GGCGGCATGAACCGGAGGCCCATCCTCACCATCATCACACTGGAAGACTCCAGTGGTAATCTACTGGGAC
GGAACAGCTTTGAGGTGCGTGTTTGTGCCTGTCCTGGGAGAGACCGGCGCACAGAGGAAGAGAATCTCCG
CAAGAAAGGGGAGCCTCACCACGAGCTGCCCCCAGGGAGCACTAAGCGAGCACTGCCCAACAACACCAGC
TCCTCTCCCCAGCCAAAGAAGAAACCACTGGATGGAGAATATTTCACCCTTCAGATCCGTGGGCGTGAGC
GCTTCGAGATGTTCCGAGAGCTGAATGAGGCCTTGGAACTCAAGGATGCCCAGGCTGGGAAGGAGCCAGG
GGGGAGCAGGGCTCACTCCAGCCACCTGAAGTCCAAAAAGGGTCAGTCTACCTCCCGCCATAAAAAACTC
ATGTTCAAGACAGAAGGGCCTGACTCAGACTGACATTCTCCACTTCTTGTTCCCCACTGACAGCCTCCCA
CCCCCATCTCTCCCTCCCCTGCCATTTTGGGTTTTGGGTCTTTGAACCCTTGCTTGCAATAGGTGTGCGT
```

طراحی پرایمر برای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در پایگاه NCBI :

ابزار رایگان NCBI به نام Primer Blast، دو ابزار BLAST و طراحی پرایمر را یکجا گرد آورده است. از BLAST می‌توان برای بررسی یگانه بودن پرایمر در توالی DNA بهره جست. بعد از گرفتن توالی می توان در قسمت Primer Blast برای ناحیه مد نظر پرایمر تهیه کرد، همچنین در همان قسمت FASTA یا Gen bank می توان گزینه Pick Primer را برای دریافت پرایمر مناسب انتخاب کرد.

Homo sapiens chromosome 1, alternate assembly CHM1_1.1, whole genome s - Nucleotide - NCBI - Mozilla Firefox

File Edit View History Bookmarks Tools Help

Homo sapiens chromosome 1, alternate asse...

www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_018912.2?from=1582068458&to=1582248928&report=genbank&strand=true

```
COMMENT     REFSEQ INFORMATION: The reference sequence is identical to
            CM001609.2.
            On Aug 13, 2013 this sequence version replaced gi:409253463.
            Assembly name: CHM1_1.1
            The genomic sequence for this RefSeq record is from the
            whole-genome assembly released by the Washington University School
            of Medicine and the National Center for Biotechnology Information
            on 2013/06/14. The original whole-genome shotgun project has the
            accession AMYH00000000.2.

            ##Genome-Annotation-Data-START##
            Annotation Provider         :: NCBI
            Annotation Status           :: Full annotation
            Annotation Version          :: Homo sapiens Annotation Release 105
            Annotation Pipeline         :: NCBI eukaryotic genome annotation
                                           pipeline
            Annotation Software Version :: 5.1
            Annotation Method           :: Best-placed RefSeq; Gnomon
            Features Annotated          :: Gene; mRNA; CDS; ncRNA
            ##Genome-Annotation-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..18048
                     /organism="Homo sapiens"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /chromosome="1"
                     /cell_line="CHM1htert"
                     /tissue_type="hydatidiform mole"
                     /note="haploid cell line"
     gene            complement(<1..>18048)
                     /gene="NTRK1"
                     /gene_synonym="MTC; p140-TrkA; TRK; Trk-A; TRK1; TRKA"
                     /note="neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 1;
                     Derived by automated computational analysis using gene
                     prediction method: BestRefSeq."
                     /db_xref="GeneID:4914"
                     /db_xref="HGNC:8031"
```

Analyze this sequence

Run BLAST

Pick Primers

Related information

Assembly

BioAssay by RNA target

BioProject

Components (Core)

Gene

GeneView in dbSNP

Genome

HomoloGene

Identical GenBank Sequence

mRNA

Protein

PubMed (Weighted)

Taxonomy

Recent activity

Turn Off Clear

Homo sapiens chromosome 1, alternate assembly CHM1_1.1, whole genom Nucleotide

INSR insulin receptor [Homo sapiens] Gene

INSRR insulin receptor-related receptor

در این قسمت می توان شرایط دلخواه را برای تکثیر پرایمر انتخاب کرد ، مانند بازه دمایی دلخواه برای دمای اتصال پرایمر ها، طول محصول PCR و غیره.

Primer designing tool - Mozilla Firefox

File Edit View History Bookmarks Tools Help

Primer designing tool

www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome

Primer-BLAST A tool for finding specific

توالی قطعه مورد نظر

NCBI/ Primer-BLAST: Finding primers specific to your PCR template (using Primer3 and BLAST). More...

Reset page Save search parameters Retrieve recent results

PCR Template

Enter accession, gi, or FASTA sequence (A refseq record is preferred) Clear

AT
CTCATACCCTACCCCCTCTAAGCTCAGGAACAACTGATGCATCTTTGTGGGGGCTGGGAGAACAGGTT
GG
AGTTCTCTGGGG

Range

From To

Forward primer

Reverse primer

Clear

Or, upload FASTA file Browse... No file selected.

Primer Parameters

Use my own forward primer (5'->3' on plus strand)

Use my own reverse primer (5'->3' on minus strand)

طول محصول PCR را می توان تعیین کرد

	Min	Max
PCR product size	100	500
# of primers to return	5	

	Min	Opt	Max	Max Tm difference
Primer melting temperatures (Tm)	66.0	72.0	73.0	3

Exon/intron selection

A refseq mRNA sequence as PCR template ... for options in the secti...

Exon junction span: No preference

Exon junction match: Exon at 5' side 7, Exon at 3' side 4

تعیین بازه دمایی دلخواه برای اتصال پرایمر ها

Primer designing tool - Mozilla Firefox

File Edit View History Bookmarks Tools Help

IRS1 insulin receptor substrate 1 [Homo ... | Primer designing tool | Primer-Blast results

www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?ORGANISM=9606&INPUT_SEQUENCE=NC_000002.11&LINK_LOC=r

Yahoo

7 4

Minimal number of bases that must anneal to exons at the 5' or 3' side of the junction

Intron inclusion: Primer pair must be separated by at least one intron on the corresponding genomic DNA

Intron length range: Min 1000, Max 1000000

Note: Parameter ...

in yellow

اگر توالی ژنها مد نظر است این گزینه انتخاب شود

Primer Pair Specificity Checking Parameters

Specificity check: Enable search for primer pairs specific to the intended P...

Database: Genome (chromosomes from all organisms)

Organism: 9606

Enter an organism name, ...onomy id or select from the suggestion list as you type.

Add more organisms

Exclusion (opional): Exclude predicted Refseq transcripts (accession ... sequences

Entrez query (optional)

نوع ارگانیسم مشخص شود

Primer specificity stringency: Primer must have at least 2 total mismatches to unin... at least 2 mismatches within the last 5 bps at the 3'... Ignore targets that have 6 or more mismatches to the primer.

Misprimed product size deviation: 4000

Splice variant handling: Allow primer to amplify mRNA splice variants (requires refseq mRNA sequence as PCR template input)

Get Primers | Show results in a new window | Use new graphic view

Primer-Blast results - Mozilla Firefox

Primer-BLAST

طول پرایمر

دمای anealing

درصد بازهای GC در پرایمر ها

Detailed primer reports

Primer pair 1

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CCTGCGTGCCGGCCCTGGGAA	21	71.99	76.19	6.00	1.00
Reverse primer	GTCCCGGGGCGCGTGGGACT	20	71.61	80.00	6.00	2.00

Products on target templates

>NC_018912.2 Homo sapiens chromosome 1, alternate assembly CHM1_1.1, whole genome

طول محصول

```
product length = 116
Features associated with this product:
   high affinity nerve growth factor receptor isoform 3

Forward primer   1          CCTGCGTGCCGGCCCTGGGAA  21
Template         158225105  .....................  158225085

Reverse primer   1          GTCCCGGGGCGCGTGGGACT  20
Template         158224990  ....................  158225009
```

>NC_000001.10 Homo sapiens chromosome 1, GRCh37.p13 Primary Assembly

```
product length = 116
Features associated with this product:
```

همردیفی توالی و جستجوی BLAST:

مقایسه دو توالی:

در دهه ۸۰، هیچ برنامه رایانه‌ای در دسترس نبود تا یک محقق بتواند بین تعدادی توالی پروتئینی، توالی را که بیشترین مشابهت به توالی خود داشته باشد، پیدا کند نداشت. بنابراین زبده ترین دانشمندان آن روزها نیز مجبور بودند برای رسیدن به هدف خود از چشمانشان استفاده کنند. به طور مثال، اگر قرار بود از بین سه توالی زیر مشابه ترین توالی را به توالی خود انتخاب می کردیم، باید تک تک توالی ها را با توالی مورد نظرشان مقایسه می کردند و میزان شباهات را در هر مقایسه به دست می آوردند. امروزه به نوع مقایسه همردیفی دوگانه توالی (Pairwise sequence Alignment) گفته می شود.

توالی مورد نظر : AATTGGCCTTGC

AATGCGCCGTGC

TTTTGCCCAAGG

AAGCCGAAGTGA

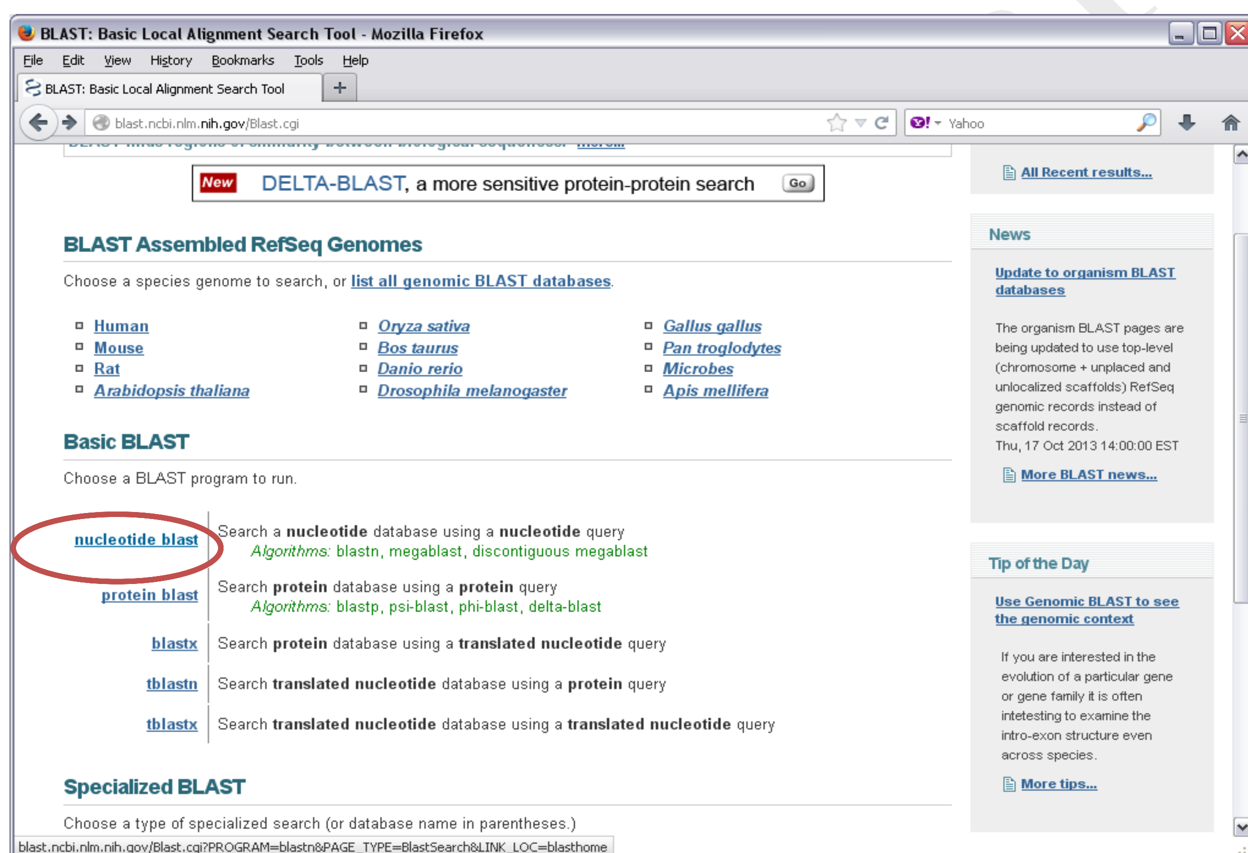
توالی های پیشنهادی که اولین توالی در مقایسه با توالیهای دیگر بیشترین شباهت را دارد.

ساده ترین راه برای پیدا کردن مشابه ترین توالی این است که دو توالی را در زیر هم قرار دهیم و یک به یک باز ها را با هم مقایسه کنیم تا شبیه ترین توالی را پیدا کنیم. ولی سوالی که پیش می‌آید این است که چگونه و با چه معیاری دو توالی مشابه تر را انتخاب می‌کنیم؟

BLAST چگونه کار می کند؟

آنچه در برنامه BLAST انجام می شود پیدا کردن جفت قطعاتی مشابهی از توالی است که امتیاز همردیفی آن ها از یک حد آستانه مشخصی بالاتر باشد.

BLAST انواع گوناگون دارد که در شکل قابل مشاهده میباشد برای پیدا کردن قطعات مشابهی از توالی DNA از nucleotide BLASTاستفاده می شود.



-مراحل اولیه تنظیمات صفحه BLAST

Protein BLAST: search protein databases using a protein query - Microsoft Internet Explorer

File Edit View Favorites Tools Help

Address http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi?PAGE=Proteins&PROGRAM=blastp&BLAST_PROGRAMS=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on

BLAST Basic Local Alignment Search Tool

Home | Recent Results | Saved Strategies | Help

My NCBI [Sign In] [Register]

NCBI/ BLAST/ blastp suite: BLASTP programs search protein databases using a protein query. more... Reset page Bookmark

1 Enter Query Sequence

Enter accession number, gi, or FASTA sequence Clear

2 Query subrange From To

3 Or, upload file Browse...

Job Title

Enter a descriptive title for your BLAST search

4 Choose Search Set

Database Non-redundant protein sequences (nr)

5 Organism Optional Enter organism name or id--completions will be suggested

Enter organism common name, binomial, or tax id. Only 20 top taxa will be shown.

6 Entrez Query Optional

Enter an Entrez query to limit search

7 Program Selection

Algorithm

- blastp (protein-protein BLAST)
- PSI-BLAST (Position-Specific Iterated BLAST)
- PHI-BLAST (Pattern Hit Initiated BLAST)

Choose a BLAST algorithm

8 BLAST Search database nr using Blastp (protein-protein BLAST)

Show results in a new window

❶ در این بخش توالی مورد نظر با فرمت FASTA یا در صورت دانستن شماره دسترسي آن را وارد می کنیم.

❷ در این بخش می توانیم فقط قسمتی از توالی را مشخص کنیم که می خواهیم مورد جستجو قرار گیرد.

❸ با استفاده از این بخش می توان توالی را از جایی که ذخیره کرده ایم upload کنیم. در این صورت نیازی بـه وارد کـردن تـوالی در بخـش ۱ نیسـت. در بخـش job title ایـن قسمت می توانیم برای جسـتجوی خود توضیح مختصری وارد کنیم.

❹ ایـن بخـش مربـوط بـه نـوع پایگـاه داده‌هاسـت کـه مـی‌خـواهیم تـوالی مـا در آن جسـتجو شـود. بـه صـورت پیش‌فـرض کلیـه پایگـاه‌هـای مشـابه یـا nr (nonredundent) مورد هدف است.

❺ این بخش مربوط به انتخاب نوع موجود زنده مورد نظر ما است که گزینه ای اختیاری است و در صورتی که ما در موجود خاصی فقط بخواهیم جستجو شود از این بخش باید استفاده کنیم.

❻ این بخش مربوط به جستجوی توالی ما در entrez است که اختیاری است و می‌توانیم جستجو در مورد توالی خود را با کلید واژه محدود کنیم.

❼ در ایـن بخـش نـوع الگـوریتم BLAST را مشـخص مـی کنـیم. الگـوریتم هـای دیگـر دارای کـاربرد های دیگر و انتخاب آن ها نیاز به بیـنش دقیـق در مـورد خـانوادۀ ی پروتئینی مورد مطالعه دارد.

❽ بعد انتخاب گزینه های مورد نظر از و توالی الگو با کلیک بر روی نمایه ی BLAST جستجو آغاز مي‌شود.

صفحه نتایج:

بعد از وارد کردن توالی در جایگاه مربوطه و انتخاب پارامتر های مورد نظر، زمانی که کلید BLASTرا می‌زنیم صفحه ای باز می شود که اطلاعات مختصری را در مورد توالی ما می دهد و اعلام می کند که جستجوی ما در حال انجام است و نتایج بعد از چند ثانیه نشان داده خواهند شد. در صورت شلوغ بودن سرور سایت اعلام می کند که جستجوی خود را در زمانی دیگر دوباره انجام دهیم.

صفحه ی نتایج شامل سه بخش است:

بخش اول شامل توضیحاتی در مورد در مورد الگوریتم BLAST و نویسندگان این الگوریتم و ویرایش هایی است که در گذشته و حال مورد استفاده هستند .در این بخش جستجوی ما دارای یک ID است که در صورت لزوم (مثلا بروز مشکل و درخواست کمک از مدیر پایگاه) می توانیم با اینID به جستجوی خود در NCBIدسترسی داشته باشیم .این بخش توضیحاتی در مورد پایگاه داده ای که ما برای جستجوی خود انتخاب کرده ایم نیز می دهد.

NCBI Blast:gi|15242042|ref|NP_200524.1| ATPAP28/PAP28... - Microsoft Internet Explorer

File Edit View Favorites Tools Help

Address http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi

BLAST Basic Local Alignment Search Tool

Home Recent Results Saved Strategies Help

My NCBI [Sign In] [Register]

NCBI/ BLAST/ blastp/ Formatting Results - RMP9PZB6015 [Reformat these Results] [Edit and Resubmit] [Sign in above to save your search strategy]

Job Title: gi|15242042|ref|NP_200524.1| ATPAP28/PAP28...

Show Conserved Domains

BLASTP 2.2.17 (Aug-26-2007)

Reference:
Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Reference:
Stephen F. Altschul, John C. Wootton, E. Michael Gertz, Richa Agarwala, Aleksandr Morgulis, Alejandro A. Schäffer, and Yi-Kuo Yu "Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices", FEBS J. 272:5101-5109.

RID: RMP9PZB6015

Database: All non-redundant GenBank CDS translations+PDB+SwissProt+PIR+PRF excluding environmental samples from WGS projects
5,820,897 sequences; 2,007,793,637 total letters

If you have any problems or questions with the results of this search please refer to the BLAST FAQs
Taxonomy reports

Query= gi|15242042|ref|NP_200524.1| ATPAP28/PAP28 (purple acid phosphatase 28); acid phosphatase/ protein serine/threonine phosphatase [Arabidopsis thaliana]
Length=397

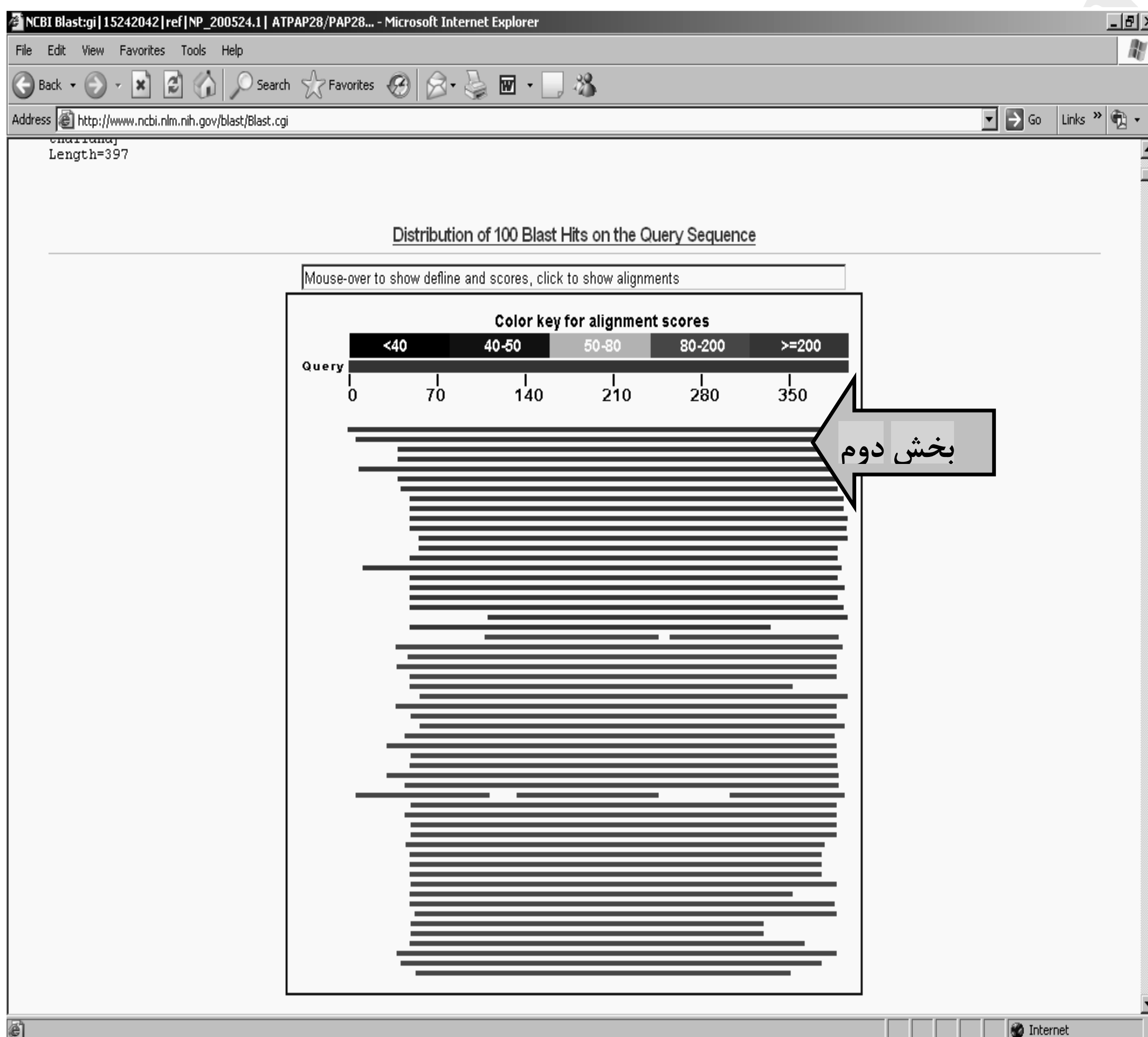
بخش اول

Distribution of 100 Blast Hits on the Query Sequence

Mouse-over to show defline and scores, click to show alignments

Color key for alignment scores

بخش دوم این صفحه نمایشی گرافیکی از نتایج BLAST است به طوری که 100 توالی اولی که در جستجوی BLAST به دست آمده اند به صورت خطوط رنگی نشان داده می شوند هر توالی بر اساس میزان شباهت خود دارای یک طیف رنگی است.کلید رمز رنگ‌ها بر اساس امتیاز همردیفی در بالای آن آمده است .هر چه قدر جور شدن توالی یافت شده با توالی در حال جستجو بیشتر باشد با رنگ قرمز و هر چه کمتر باشد با رنگ‌های رو به مشکی نمایش داده می شود .بنابراین در این قسمت در یک نگاه کلی می‌توانیم میزان شباهت را مشاهده کنیم.



بخش سوم در بخش سوم شماره دسترسی (شماره ۱) و نام (شماره ۲) توالی های بدست آمده فهرست شده‌اند. روبروی هر توالی دو عدد هست .اولین عدد امتیاز همردیفی دوگانه (شماره ۳) توالی یافت شده و توالی در حال جستجو است که کلیه اطلاعات بعدی بر اساس آنها مرتب می‌شوند. دومین شاخص، ارزش مورد انتظار یا E-value (شماره ۴) است .تعریف این شاخص به صورت ساده این است:

"چه قدر احتمال دارد که توالی جفت شده با توالی الگوی ما به طور تصادفی جفت شده باشد و هیچ رابطه ی معنی‌ذاری بین آنها وجود نداشته باشد."

این احتمال از رابطه زیر به دست می‌آید:

$$E = Kmn\, e^{-\lambda S} \qquad (1)$$

امتیاز همردیفی و احتمال آن

NCBI Blast:gi|15242042|ref|NP_200524.1| ATPAP28/PAP28... - Microsoft Internet Explorer

File Edit View Favorites Tools Help

Back Search Favorites

Address http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi Go Links

Dist ۱ tree of results NEW

Seq ۱ producing significant alignments: ۲ ۳ ۴

۱	۲	Score (Bits) ۳	E Value ۴	
ref|NP_200524.1|	ATPAP28/PAP28 (purple acid phosphatase 28); ...	827	0.0	U G
emb|CAO69575.1|	unnamed protein product [Vitis vinifera]	497	5e-139	
ref|NP_001058469.1|	Os06g0699200 [Oryza sativa (japonica cult...	476	9e-133	U G
gb|EAZ38165.1|	hypothetical protein OsJ_021648 [Oryza sativa ...	474	4e-132	
emb|CAO69577.1|	unnamed protein product [Vitis vinifera]	466	9e-130	
dbj|BAD53995.1|	calcineurin-like phosphoesterase-like [Oryza ...	458	3e-127	
gb|ABK25414.1|	unknown [Picea sitchensis]	357	7e-97	
emb|CAO24353.1|	unnamed protein product [Vitis vinifera]	350	7e-95	
emb|CAO24355.1|	unnamed protein product [Vitis vinifera]	348	3e-94	
gb|ABK93944.1|	unknown [Populus trichocarpa]	348	5e-94	
ref|NP_201119.1|	ATPAP29/PAP29 (purple acid phosphatase 29); ...	337	1e-90	U G
gb|EAZ09865.1|	hypothetical protein OsI_031097 [Oryza sativa ...	336	2e-90	
ref|NP_001063768.1|	Os09g0533300 [Oryza sativa (japonica cult...	336	2e-90	U G
gb|EDQ67382.1|	predicted protein [Physcomitrella patens subsp. p	336	2e-90	
emb|CAB76911.1|	putative PTS protein [Cicer arietinum]	323	9e-87	
gb|EDQ73201.1|	predicted protein [Physcomitrella patens subsp. p	288	4e-76	
gb|AAC34232.2|	hypothetical protein [Arabidopsis thaliana] >g...	274	9e-72	
ref|NP_182211.2|	ATPAP14/PAP14; acid phosphatase/ protein ser...	274	1e-71	U G
gb|AAW29948.1|	putative purple acid phosphatase [Arabidopsis tha	273	1e-71	U
gb|EAZ45468.1|	hypothetical protein OsJ_028951 [Oryza sativa ...	270	1e-70	
ref|NP_973704.1|	ATPAP14/PAP14; protein serine/threonine phos...	241	7e-62	U G
gb|ABD28480.2|	hypothetical protein MtrDRAFT_AC148819g26v2 [M...	194	6e-48	
ref|XP_721089.1|	hypothetical protein CaO19_8463 [Candida alb...	191	6e-47	G
gb|ABD28479.2|	hypothetical protein MtrDRAFT_AC148819g23v2 [M...	186	2e-45	
ref|XP_457179.1|	hypothetical protein DEHA0B04873g [Debaryomy...	185	4e-45	G
ref|XP_001484308.1|	hypothetical protein PGUG_03689 [Pichia g...	182	4e-44	G
ref|XP_001383460.2|	predicted protein [Pichia stipitis CBS 60...	181	1e-43	G
ref|XP_001695709.1|	metallophosphoesterase, phosphate-repress...	175	5e-42	U G
ref|XP_504306.1|	hypothetical protein [Yarrowia lipolytica] >...	168	8e-40	G
ref|XP_001528742.1|	conserved hypothetical protein [Lodderomy...	166	2e-39	G
dbj|BAE54779.1|	unnamed protein product [Aspergillus oryzae]	165	4e-39	
ref|XP_001643342.1|	hypothetical protein Kpol_472p15 [Vanderw...	161	8e-38	G
ref|XP_364364.2|	hypothetical protein MGG_09209 [Magnaporthe ...	160	2e-37	G
ref|XP_382022.1|	hypothetical protein FG01846.1 [Gibberella zeae	160	2e-37	G
ref|XP_001272124.1|	phosphoesterase, putative [Aspergillus cl...	152	3e-35	G

بعد از تهیه پرایمر دلخواه برای قطعه مورد نظر؛ برای نتیجه مطلوب بهتر است توالی آن هم در Primer BLAST و هم در nucleotide BLAST چک شود.

برای چک کردن پرایمر ها در Primer BLAST مطابق شکل های زیر می توان عمل کرد.

توالی پرایمر Forward اینجا وارد شود

توالی پرایمر Reverse اینجا وارد شود

Primer designing tool - Mozilla Firefox

File Edit View History Bookmarks Tools Help

Primer designing tool

www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome

Exon junction span	No preference
Exon junction match	Exon at 5' side: 7 · Exon at 3' side: 4 · Minimal number of bases that must anneal to exons at the 5' or 3' side of the junction
Intron inclusion	☐ Primer pair must be separated by at least one intron on the corresponding genomic DNA
Intron length range	Min: 1000 · Max: 1000000

Note: Parameter v... in yellow

اگر توالی ژنهای کروزومی مد نظر است این گزینه انتخاب شود

Primer Pair Specificity Checking Parameters

Specificity check	☑ Enable search for primer pairs specific to the intende... template
Database	Genome (chromosomes from all organisms)
Organism	Homo sapiens · Enter an organism name, taxonomy id or select from the suggestion list as you type. · Add more organisms
Exclusion (opional)	☐ Exclude predicted Refseq transcripts (accession with XM, XR prefix) ☐ Exclude uncultured/environmental sample sequences
Entrez query (optional)	
Primer specificity stringency	Primer must have at least 2 total mismatches to unintended targets, including at least 2 mismatches within the last 5 bps at the 3' end. Ignore targets that have 6 or more mismatches to the primer.
Misprimed product size deviation	4000
Splice variant handling	☐ Allow primer to amplify mRNA splice variants (requires refseq mRNA sequence as PCR template input)

Primer-Blast results - Mozilla Firefox

File Edit View History Bookmarks Tools Help

Primer-Blast results

www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/primertool.cgi?ctg_t...

Primer-BLAST

NCBI/ Primer-BLAST ... 130.14.18.128_9001_pri... more...

دمای anealing

درصد بازهای GC در پرایمر ها

طول پرایمر

نوع ارگانیسم و اسم ناحیه ای که پرایمر متصل می شود

In...
Specificity ... were found in select... atabase: Reference ... ...ited to Homo sapiens)
Other reports ... mmary

...iled primer reports

...rimer pair 1

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
...ward primer	CCTGCGTGCCGGCCCTGGGAA	21	71.99	76.19	6.00	1.00
...e primer	GTCCCGGGGCGCGTGGGACT	20	71.61	80.00	6.00	

Products on target templates

طول محصول

>NC_018912.2 Homo sapiens chromosome 1, alternate assembly CHM... genome sh...

```
product length = 116
Features associated with this product:
   high affinity nerve growth factor receptor isoform 3

Forward primer  1          CCTGCGTGCCGGCCCTGGGAA  21
Template        158225105  .....................  158225085

Reverse primer  1          GTCCCGGGGCGCGTGGGACT  20
Template        158224990  ....................  158225009
```

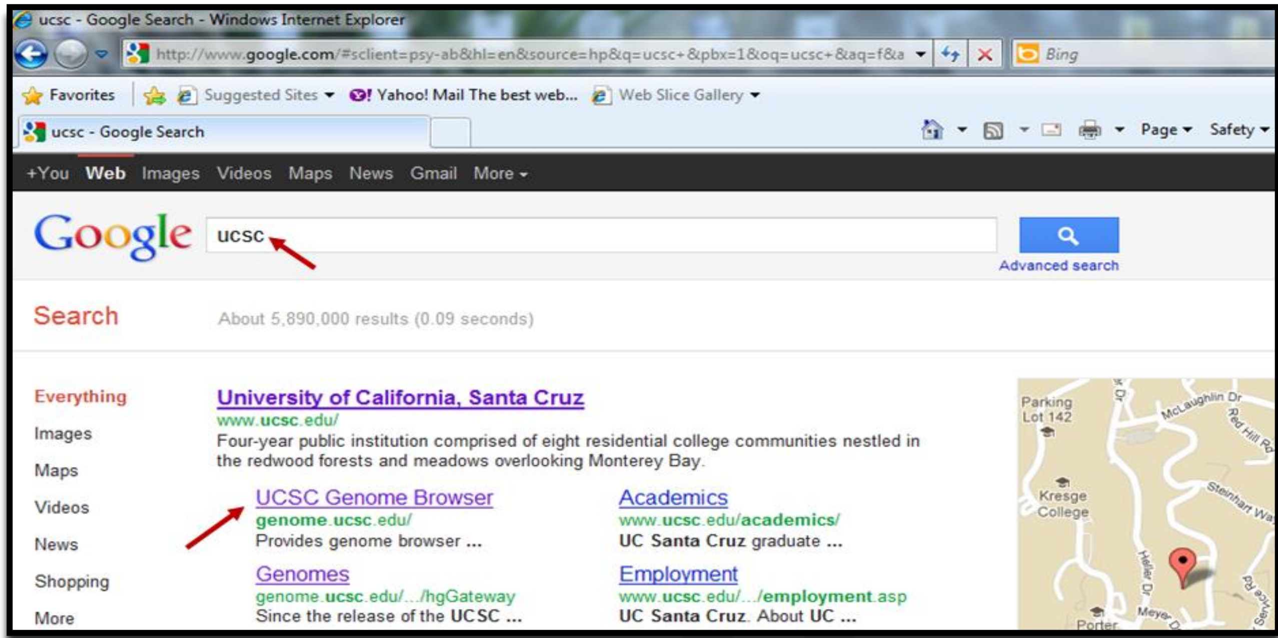
>NC_000001.10 Homo sapiens chromosome 1, GRCh37.p13 Primary Assembly

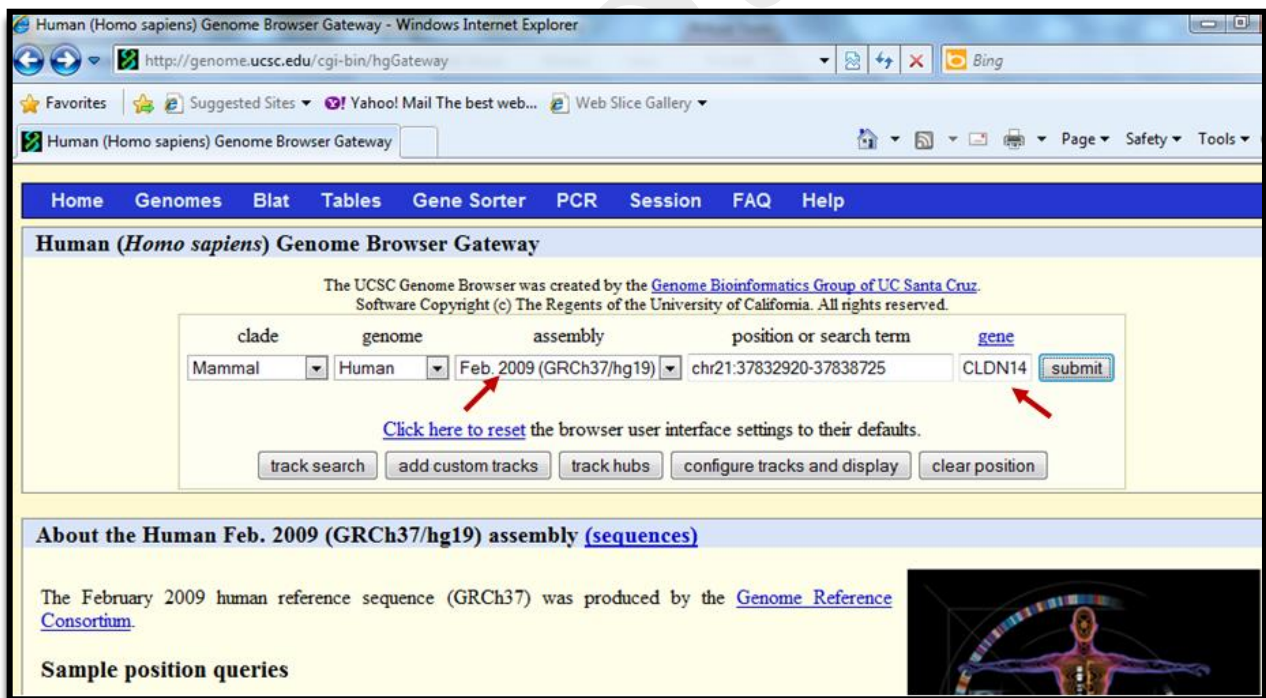
```
product length = 116
Features associated with this product:
```

Primer-Blast results - Mozilla Firefox

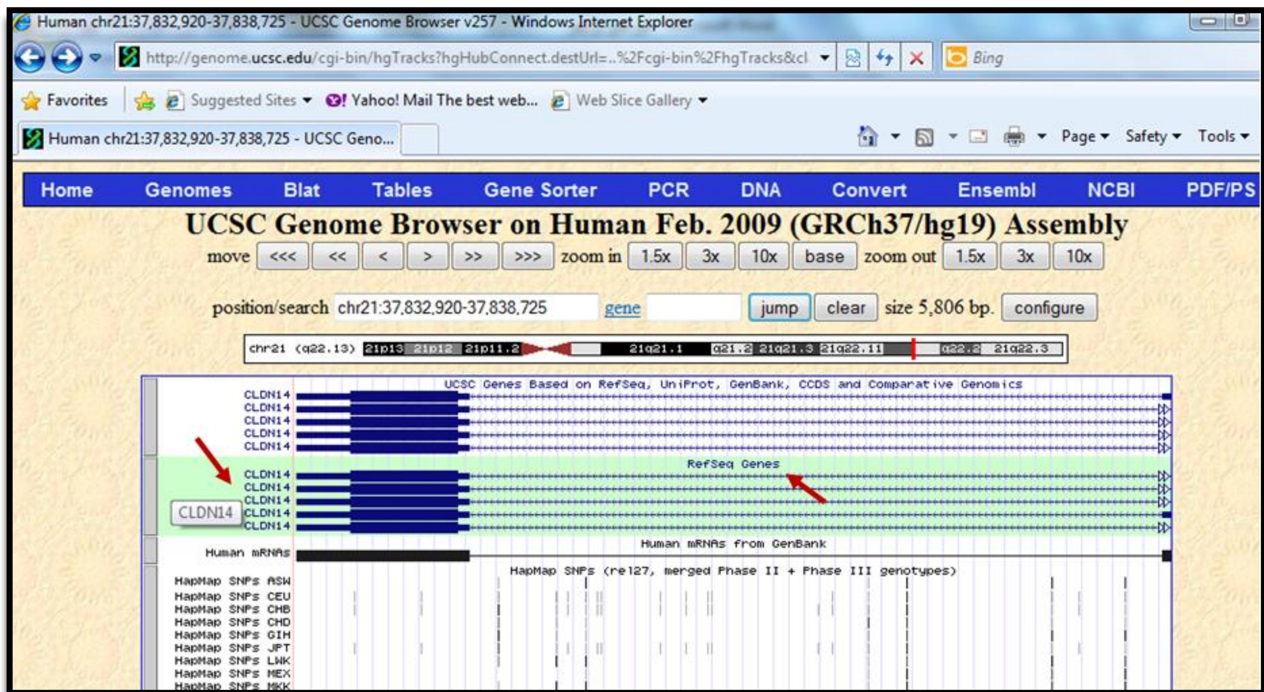
جستجو در پایگاه اطلاعات UCSC:

می توانیم اطلاعات مربوط به ژن مورد نظر و یا اگزون مربوطه را (مثلا ژن CLDN14) را در سایت Genome UCSC Browser ، جستجو کنیم:





و در صفحه نتیجه ، گزینه refseq Genes را انتخاب میکنیم. که نشان دهنده توالی reference از ژن مورد نظر می باشد. و به این ترتیب توالی کامل اگزون ها و اینترون های ژن به دست می آید.



OMIM: 605608
Entrez Gene: 23562
PubMed on Gene: CLDN14
PubMed on Product: claudin-14
GeneCards: CLDN14
AceView: CLDN14
Stanford SOURCE: NM_144492

Summary of CLDN14

Tight junctions represent one mode of cell-to-cell adhesion in epithelial or endothelial cell sheets, forming continuous seals around cells a barrier to prevent solutes and water from passing freely through the paracellular space. These junctions are comprised of sets of continuo the outwardly facing cytoplasmic leaflet, with complementary grooves in the inwardly facing extracytoplasmic leaflet. The protein encoded of the claudin family, is an integral membrane protein and a component of tight junction strands. The encoded protein also binds specificall Yes-associated protein. Defects in this gene are the cause of an autosomal recessive form of nonsyndromic sensorineural deafness. It is synonymous variants in this gene are associated with kidney stones and reduced bone mineral density. Several transcript variants encodin been found for this gene. [provided by RefSeq, Jun 2010].

mRNA/Genomic Alignments

BROWSER	SIZE	IDENTITY	CHROMOSOME	STRAND	START	END	QUERY	START	END	TOTAL
browser	1941	100.0%	21	-	37832920	37852388	NM_144492	1	1941	1958

اینترون ها با حروف کوچک و سیاه نمایش داده می شوند، در حالیکه اگزون ها با حروف بزرگ نوشته شده اند. بخش هایی از اگزون ها که non-coding هستند، قرمز رنگ، و قسمت های coding به رنگ آبی مشاهده می گردند.

در سمت چپ صفحه، عبارتblock و عدد مقابل آن، نماینده اگزون ها و شماره آنها می باشند؛ که با انتخاب هر یک می توانیم توالی اگزون مربوطه، و coding یا non-coding بودن آن را مشاهده کنیم.

http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgc?hgsid=219251317&g=htcCdnaAli&i=NM_144492&c=chr21

Favorites | Suggested Sites | Yahoo! Mail The best web... | Web Slice Gallery

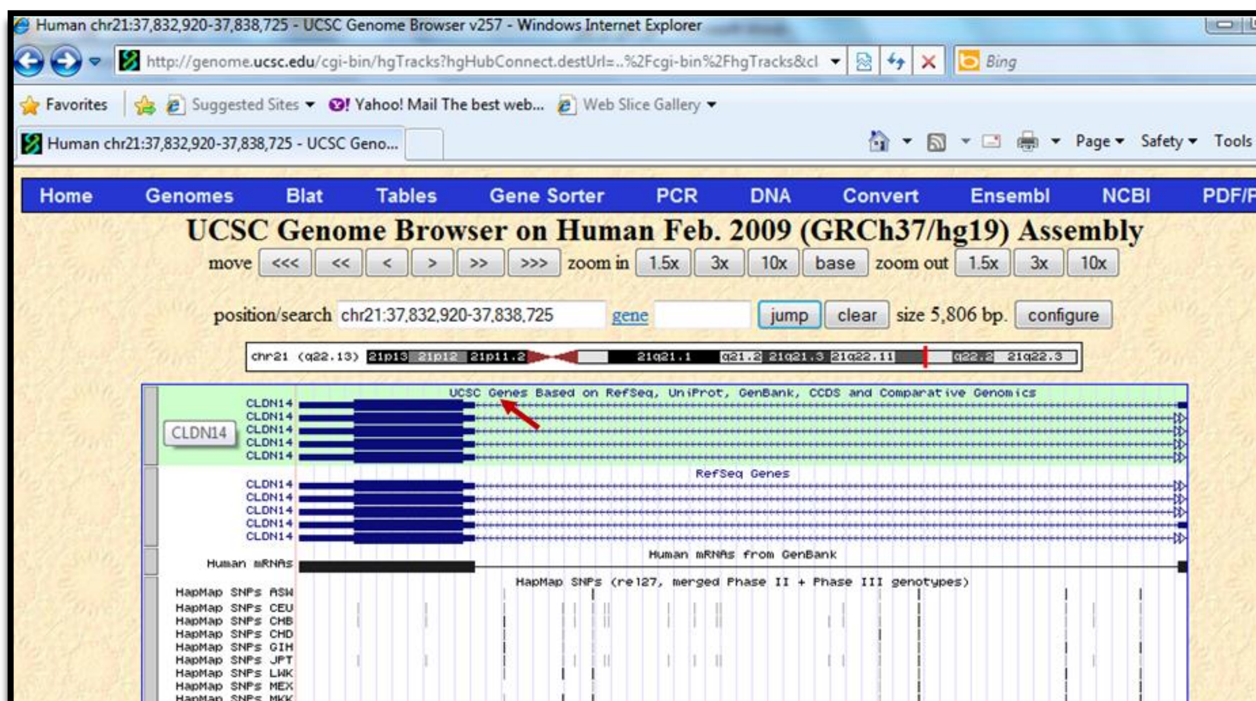
NM_144492 vs Genomic [refSeqAli]

Alignment of NM_144492

NM_144492
Human.chr21
block1
block2
block3
together

```
gtggacataa gcagaacttc cggcaggtgg ctggaaccct tccctgaggc  37834289
cagcgtccgg ctgtcatccc ttcagatccc accttcccag gaaagcagtt  37834239
actctcccac ccagtgaagt ctcagaaact atttttgaga acatgctaat  37834189
tgccacacca accacctatg aaaaacttgg tttcggtgac agaaataagt  37834139
gcatgagata atctttaacc catttccttt ctctccctgc tcccgcctcc  37834089
cttggcttca ttagGGCTCC GGCTGGCACC TGAGGAGCGG CGTGACCCCG  37834039
AGGGCCCAGG GAGCTGCCCG GCTGGCCTAG GCAGGCAGCC GCACCATGGC  37833989
CAGCACGGCC GTGCAGCTTC TGGGCTTCCT GCTCAGCTTC CTGGGCATGG  37833939
TGGGCACGTT GATCACCACC ATCCTGCCGC ACTGGCGGAG GACAGCGCAC  37833889
GTGGGCACCA ACATCCTCAC GGCCGTGTCC TACCTGAAAG GGCTCTGGAT  37833839
GGAGTGTGTG TGGCACAGCA CAGGCATCTA CCAGTGCCAG ATCTACCGAT  37833789
CCCTGCTGGC GCTGCCCCAA GACCTCCAGG CTGCCCGCGC CCTCATGGTC  37833739
ATCTCCTGCC TGCTCTCGGG CATAGCCTGC GCCTGCGCCG TCATCGGGAT  37833689
GAAGTGCACG CGCTGCGCCA AGGGCACACC CGCCAAGACC ACCTTTGCCA  37833639
TCCTCGGCGG CACCCTCTTC ATCCTGGCCG GCCTCCTGTG CATGGTGGCC  37833589
GTCTCCTGGA CCACCAACGA CGTGGTGCAG AACTTCTACA ACCCGCTGCT  37833539
GCCCAGCGGC ATGAAGTTTG AGATTGGCCA GGCCCTGTAC CTGGGCTTCA  37833489
TCTCCTCGTC CCTCTCGCTC ATTGGTGGCA CCCTGCTTTG CCTGTCCTGC  37833439
CAGGACGAGG CACCCTACAG GCCCTACCAG GCCCCGCCCA GGGCCACCAC  37833389
GACCACTGCA AACACCGCAC CTGCCTACCA GCCACCAGCT GCCTACAAAG  37833339
ACAATCGGGC CCCCTCAGTG ACCTCGGCCA CGCACAGCGG GTACAGGCTG  37833289
AACGACTACG TGTGAGTCCC CACAGCCTGC TTCTCCCCTG GGCTGCTGTG  37833239
GGCTGGGTCC CCGGCGGGAC TGTCAATGGA GGCAGGGGTT CCAGCACAAA  37833189
GTTTACTTCT GGGCAATTTT TGTATCCAAG GAAATAATGT GAATGCGAGG  37833139
AAATGTCTTT AGAGCACAGG GACAGAGGGG GAAATAAGAG GAGGAGAAAG  37833089
CTCTCTATAC CAAAGACTGA AAAAAAAAAT CCTGTCTGTT TTTGTATTTA  37833039
TTATATATAT TTATGTGGGT GATTTGATAA CAAGTTTAAT ATAAAGTGAC  37832989
```

حال جهت طراحی پرایمر به این ترتیب پیش میرویم: ما می‌توانیم از پرایمرهای از پیش طراحی شده که در سایت وجود دارد استفاده کنیم. بعد از به دست آوردن اطلاعات مربوط به ژن مورد نظر و یا اگزون مربوطه (مراحل آن در بالا به ترتیب ذکر شد) ابتدا با انتخاب گزینه UCSC Genes همانطور که در شکل زیر آمده صفحه ای جدید نمایش داده می شود.



Human Gene CLDN14 (uc002yvm.1) Description and Page Index

Description: claudin 14
RefSeq Summary (NM_144492): Tight junctions represent one mode of cell-to-cell adhesion in epithelial or endothelial cell sheets, forming continuous seals around cells and serving as a physical barrier to prevent solutes and water from passing freely through the paracellular space. These junctions are comprised of sets of continuous networking strands in the outwardly facing cytoplasmic leaflet, with complementary grooves in the inwardly facing extracytoplasmic leaflet. The protein encoded by this gene, a member of the claudin family, is an integral membrane protein and a component of tight junction strands. The encoded protein also binds specifically to the WW domain of Yes-associated protein. Defects in this gene are the cause of an autosomal recessive form of nonsyndromic sensorineural deafness. It is also reported that four synonymous variants in this gene are associated with kidney stones and reduced bone mineral density. Several transcript variants encoding the same protein have been found for this gene. [provided by RefSeq, Jun 2010].
Strand: - **Genomic Size:** 19469 **Exon Count:** 2 **Coding Exon Count:** 1

Page Index	Sequence and Links	UniProtKB Comments	Microarray	RNA Structure	Protein Structure
Other Species	GO Annotations	mRNA Descriptions	Pathways	Other Names	Model Information
Methods					

Data last updated: 2009-10-08

Sequence and Links to Tools and Databases

Genomic Sequence (chr21:37,832,920-37,852,388)			mRNA (may differ from genome)		Protein (239 aa)
Gene Sorter	Genome Browser	Protein FASTA	Table Schema	CGAP	Ensembl
Entrez Gene	ExonPrimer	GeneCards	GeneNetwork	Gepis Tissue	H-INV
HGNC	HPRD	Jackson Lab	OMIM	PubMed	Reactome
Stanford SOURCE	Treefam	UniProtKB	User annotations		

Helmholtz Center Munich
Institute of Human Genetics

Patient Information
Research
MitoP2
SNPs
Publications
Address
Staff

Links
Genetic Databases
Genetic Journals
WWW Information

About ExonPrimer

ExonPrimer is a Perl script that helps to design intronic primers for the PCR amplification of exons. The positions of the exons within the genome assembly are provided by the UCSC genome browser. PCR primers to amplify each exon are designed using Primer3. The user can define the maximum exon size. Exons larger than this size will be divided into several parts. Exons with small introns in-between are combined. All SNP positions in the human genome are masked with N's in order to avoid primers to be positioned across these sites. Prior to primer design the sequence around exons can be masked with gfClient from the Blat suite.
Please, use the following link for sequences which do not have a link in the UCSC genome browser.

ExonPrimer options

Primers will be designed for: **uc002yvm.1 (hg19)**
Design primers for the coding sequence or the entire cDNA.
CDS Entire cDNA
Minimal distance between primer and exon/intron boundary
35 bp
Primer region
70 bp
Maximal target (exon) size. Exons larger than 'maximal target size' will be divided.
500 bp Overlap 50 bp

Primer3 options

Annealing temperature 60 °C | GC clamp | Mispriming library human
Primer size
Minimum: 17 bp Optimum: 20 bp Maximum: 27 bp
Maximum length of a mononucleotide repeat, for example AAAA.
4 bp

Reference sequence

An EMBL formatted sequence file will be generated containing exons and intron/exon boundaries. The sequence can be imported as reference sequence into the Staden package.
Maximal intron length 1000 Additional intronic sequence will be deleted.

submit Reset

Helmholtz Center Munich
Institute of Human Genetics

Patient Information
Research
MitoP2
SNPs
Publications
Address
Staff

Links
Genetic Databases
Genetic Journals
WWW Information

ExonPrimer Results

Please wait for the results. The page will be refreshed every 15 sec.
Or click on the results link: Results

```
Exon3_1: 360 bp
OLIGO            start  len     tm     gc%   any    3'   rep seq
LEFT PRIMER      19329   17   61.80   70.59  3.00  3.00 12.00 CTGAGGAGCGGCGTGAC
RIGHT PRIMER     19817   19   61.57   63.16  5.00  2.00 12.00 GTTGGTGGTCCAGGAGACG
PRODUCT SIZE: 489, PAIR ANY COMPL: 3.00, PAIR 3' COMPL: 2.00
TARGETS (start, len)*: 19360,420

19320 GGCTGGCACCTGAGGAGCGGCGTGACCCCGAGGGCCCAGGGAGCTGCCCGGCTGGCCTAG
               >>>>>>>>>>>>>>>>>                       XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

19380 GCAGGCAGCCGCACCATGGCCAGCACGGCCGTGCAGCTTCTGGGCTTCCTGCTCAGCTTC
      XXXXXXXXXXXXXXX*********************************************

19440 CTGGGCATGGTGGGCACGTTGATCACCACCATCCTGCCGCACTGGCGGAGGACAGCGCAC
      ************************************************************

19500 GTGGGCACCAACATCCTCACGGCCGTGTCCTACCTGAAAGGGCTCTGGATGGAGTGTGTG
      ************************************************************

19560 TGGCACAGCACAGGCATCTACCAGTGCCAGATCTACCGATCCCTGCTGGCGCTGCCCCAA
      ************************************************************

19620 GACCTCCAGGCTGCCCGNGCCCTCATGGTCATCTCCTGCCTGCTCTCGGGCATAGCCTGC
      ************************************************************

19680 GCCTGCGCCGTCATCGGGATGAAGTGCACGCGCTGCGCCAAGGGCACACCCGCCAAGACC
      ************************************************************

19740 ACCTTTGCCATCCTCGGCGGCACCCTCTTCATCCTGGCCGGCCTCCTGTGCATGGTGGCC
      ***************XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX                   <

19800 GTCTCCTGGACCACCAACGACGTGGTGCAGAACTTCTACAACCCGCTGCTGCCCAGCGGC
      <<<<<<<<<<<<<<<<<<                                ..........
```

در جدول این صفحه عبارت "Exon Primer"، را انتخاب می کنیم. اگر برای ژن مورد نظر ما پرایمری از پیش طراحی شده باشد، "Exon Primer" آن پرایمر را با تمام ویژگی هایش به ما نشان میدهد. در مورد ژن CLDN14 ، که ۱ اگزون کد کننده دارد، "Exon Primer" ، پرایمر های طراحی شده ی مناسبی ارائه می کند.

در غیر این صورت می باید پرایمر را به کمک سایت Primer3، طراحی کرده و آنگاه مناسب بودن آن را به وسیله سایت Oligo analyzer و یا نرم افزار Gene Runner چک نماییم.

طراحی پرایمر با برنامه Primer 3:

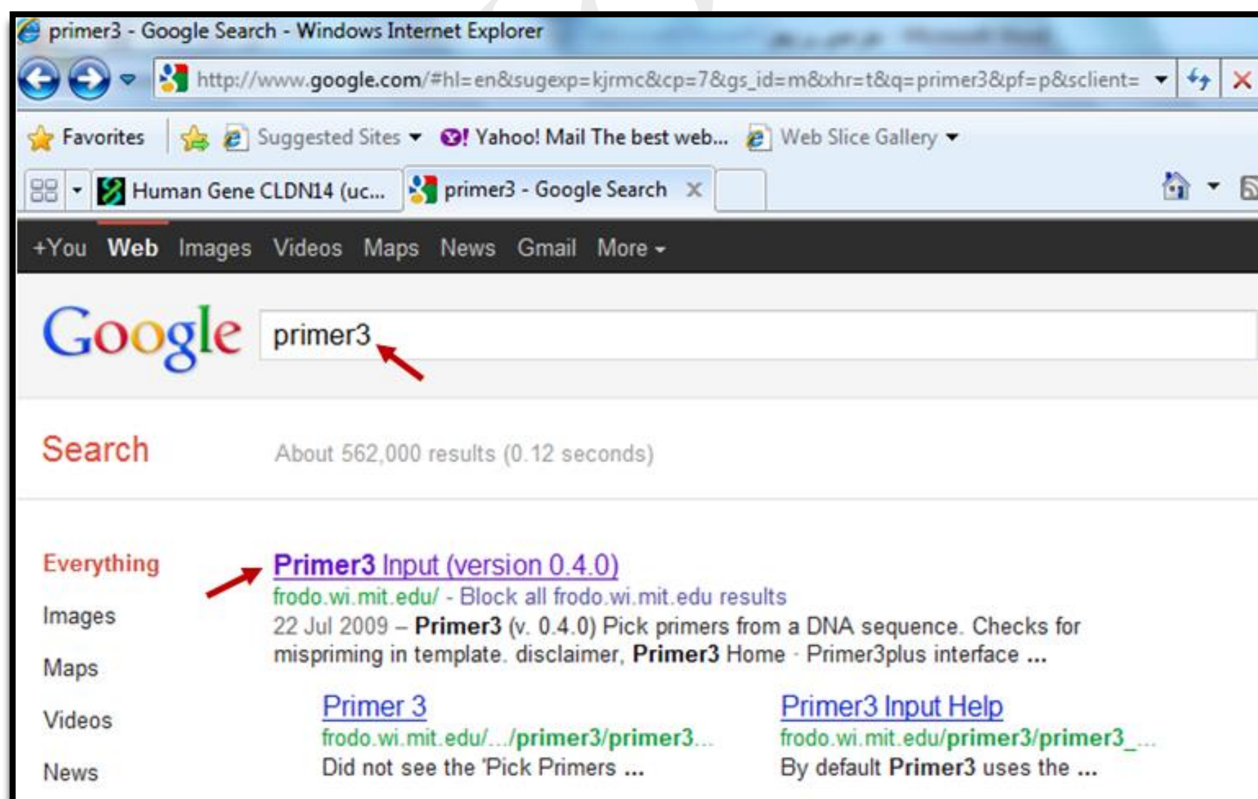
توالی قطعه مورد نظر به همراه بخشی از flanking region آن را از سایت UCSC کپی کرده و در محل مربوط به آن در سایت Primer 3، وارد می کنیم. آنگاه با توجه به این مسئله که هدف از طراحی پرایمر، چیست، بخشی از این توالی را به ترتیب نشان داده شده انتخاب میکنیم و ابتدا و انتهای آن را بوسیله [و] و یا بوسیله < و > علامت گذاری می نماییم.

لازم به توضیح است که اگر هدف از طراحی پرایمر انجام sequencing متعاقب آن باشد، همیشه ۳۰-۲۰ نوکلئوتید بالا دست و پایین دست توالی مورد نظر را هم لحاظ می نماییم. (زیرا حین sequencing معمولاً چند نوکلئوتید از ابتدای قطعه تکثیر شده خوانده نمی شود.) در حالیکه اگر پرایمر را به منظور انجام ARMS PCR طراحی کرده باشیم، دقیقا نوکلئوتید محل جهش (یا تغییر) مورد نظر باید در انتهای ´3 پرایمر قرار داشته باشد.

مثال زیر، طراحی پرایمر برای اگزون ۱۸ ژن STRC را نشان می دهد. پس از paste کردن توالی مورد نظر و مشخص نمودن محدوده ی آن، بر روی گزینه ی Pick Primers کلیک می کنیم.

اگر برای محدوده انتخاب شده، پرایمری پیشنهاد نشود، یا پرایمر پیشنهاد شده مناسب نباشد (پس از چک کردن با oligo analyze)باید اینقدر این محدوده را با جابجا کردن علامت های[و] تغییر دهیم تا پرایمری با تمام شرایط مورد نظر و مناسب هدف ما به دست آید.

نتیجه طراحی پرایمر به این شکل نمایش داده می شود.



Primer3 Input (version 0.4.0) - Windows Internet Explorer

http://frodo.wi.mit.edu/primer3/

Favorites | Suggested Sites | Yahoo! Mail The best web... | Web Slice Gallery

NM_153700 vs Genomic [r... | Primer3 Input (version ...

Page | Safety | Tools

Primer3 (v. 0.4.0) Pick primers from a DNA sequence.

Checks for mispriming in template. | disclaimer | Primer3 Home
Primer3plus interface | cautions | FAQ/WIKI

Paste source sequence below (5'->3', string of ACGTNacgtn -- other letters treated as N -- numbers and blanks ignored). FASTA format ok. Please N-out undesirable sequence (vector, ALUs, LINEs, etc.) or use a Mispriming Library (repeat library): NONE

```
agcagggagg ctgggaccct aggtatagaa cccagctcct atgttctgct  43900199
ctggcctcac actgcttccc tacagAGGGC <CTGTATCTGG GCAGAGCTAC  43900149
AGCGGAGGAT GGCAATGCCA GAACCAGAAT GGACAACTGT AGGGCCAGAA  43900099
CTGAACGGGC TGGATAGCAA GCTACTCCTG GACTTACC>gt aagtactgca  43900049
gctagagata ttggcccctc agaaagctca atctggggtg aagatctgcc  43899999
cttagggaat gccctggagg aggtagtttt tctgtctggt agttccctga  43899949
```

☑ Pick left primer, or use left primer below:

☐ Pick hybridization probe (internal oligo), or use oligo below:

☑ Pick right primer, or use right primer below (5' to 3' on opposite strand):

Pick Primers | Reset Form

```
No mispriming library specified
Using 1-based sequence positions
OLIGO            start  len     tm     gc%   any    3'  seq
LEFT PRIMER         48   23  60.47   43.48  5.00  0.00  caggctgttgtatgtgttgaatg
RIGHT PRIMER       295   24  59.02   45.83  6.00  2.00  aacataggagctgggttctatacc
SEQUENCE SIZE: 300
INCLUDED REGION SIZE: 300

PRODUCT SIZE: 248, PAIR ANY COMPL: 5.00, PAIR 3' COMPL: 1.00
TARGETS (start, len)*: 71,200

    1 gatgaacatctgtacttgtgttgagagtactgatatcaaggagcaaacaggctgttgtat
                                                   >>>>>>>>>>>>>

   61 gtgttgaatgagcctctccccactcacacacccacagGGCTCTGGGCACCCTGGCAGGAG
      >>>>>>>>>>**************************************************

  121 GCATGTCCTGTGAGTTTCTGCAGCAGATCAACTCCATGGTAGACTTCCTTGAAGTGGTGC
      ************************************************************

  181 ACATGATCTATCAGCTGCCCACTAGAGTTCGAGGGAGCCTGgtgagagggggtgcctgga
      ************************************************************

  241 ctttagtgggagcagggaggctgggaccctaggtatagaacccagctcctatgttctgct
      ******************************  <<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<
```

>>>>>> left primer

<<<<<< right primer

همانگونه که مشاهده می شود، تمام ویژگی های پرایمرهای پیشنهادی، ارائه شده است.

دمای annealing برای forward Primer : 60.47 و دمای annealing برای Reverse Primer : 59.02 است، که تفاوت چندانی با یکدیگر ندارند.

درصد GC هر دو پرایمر نیز نزدیک به هم می باشد.

در قسمت پایین همین صفحه، پرایمر های دیگری نیزتحت عنوان Additional Oligos، برای توالی مورد نظر پیشنهاد شده است، که در صورت مطاوب نبودن پرایمر اول، می توانیم از آنها نیز استفاده کنیم.

```
ADDITIONAL OLIGOS
                     start  len      tm     gc%   any    3' seq

 1 LEFT PRIMER          48   23   60.47   43.48  5.00  0.00 caggctgttgtatgtgttgaatg
   RIGHT PRIMER        293   23   57.91   47.83  6.00  0.00 cataggagctgggttctatacct
   PRODUCT SIZE: 246, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 2.00

 2 LEFT PRIMER          48   23   60.47   43.48  5.00  0.00 caggctgttgtatgtgttgaatg
   RIGHT PRIMER        295   25   59.85   44.00  6.00  0.00 aacataggagctgggttctatacct
   PRODUCT SIZE: 248, PAIR ANY COMPL: 5.00, PAIR 3' COMPL: 2.00

 3 LEFT PRIMER          48   23   60.47   43.48  5.00  0.00 caggctgttgtatgtgttgaatg
   RIGHT PRIMER        294   23   57.78   47.83  6.00  2.00 acataggagctgggttctatacc
   PRODUCT SIZE: 247, PAIR ANY COMPL: 5.00, PAIR 3' COMPL: 1.00

 4 LEFT PRIMER          48   21   57.26   42.86  5.00  3.00 caggctgttgtatgtgttgaa
   RIGHT PRIMER        295   24   59.02   45.83  6.00  2.00 aacataggagctgggttctatacc
   PRODUCT SIZE: 248, PAIR ANY COMPL: 5.00, PAIR 3' COMPL: 3.00
```

جهت اطمینان از این مسئله که پرایمر انتخاب شده، تنها به یک منطقه از کل DNA ی ژنومی متصل میشود، و تنها توالی مورد نظر ما را تکثیر خواهد کرد، آن را در قسمت PCR از سایت UCSC نیز چک می کنیم.

UCSC Genome Bioinformatics

Genomes - Blat - Tables - Gene Sorter - PCR - VisiGene - Proteome - Session - FAQ - Help

Genome Browser | ENCODE | Neandertal | Blat | Table Browser | Gene Sorter

About the UCSC Genome Bioinformatics Site

Welcome to the UCSC Genome Browser website. This site contains the reference sequence and working ENCODE and Neandertal projects.

We encourage you to explore these sequences with our tools. The Genome Browser zooms and scrolls over expression, homology and other information on groups of genes that can be related in many ways. Blat quickly to the underlying database. VisiGene lets you browse through a large collection of *in situ* mouse and frog image genome-wide data sets.

The UCSC Genome Browser is developed and maintained by the Genome Bioinformatics Group, a cross-dep at the University of California Santa Cruz (UCSC). If you have feedback or questions concerning the tools or d

به این ترتیب که توالی هر یک از پرایمر های forward و reverse را در قسمت مورد نظر وارد کرده، و نتیجه را مشاهده می کنیم.

BLAT کردن

جهت اطمینان از عدم وجود SNP (Single Nucleotide Polymorphism) می باید، پرایمر های طراحی شده را Blat کنیم. بدین منظور مجددا از سایت UCSC کمک میگیریم.

پس از انتخاب گزینه Blat، صفحه زیر باز می شود، که در محل مربوطه یکبار پرایمر Forward و یکبار پرایمر Reverse را وارد می کنیم.

Home Genomes Tables Gene Sorter PCR Session FAQ Help

Human BLAT Search

BLAT Search Genome

Genome: Human
Assembly: Feb. 2009 (GRCh37/hg19)
Query type: BLAT's guess
Sort output: query,score
Output type: hyperlink

ctgatatcaaggagcaaacagg

submit | I'm feeling lucky | clear

Paste in a query sequence to find its location in the the genome. Multiple sequences may be searched if

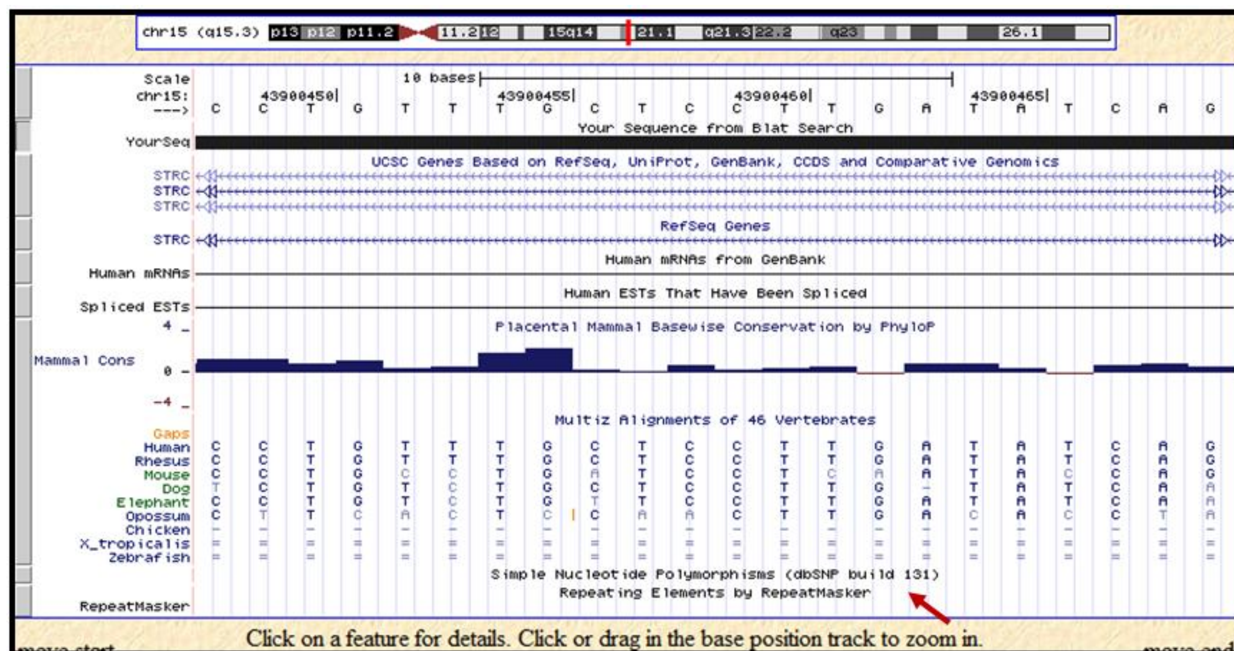
پس از submit کردن، گزینه Browser را در صفحه باز شده انتخاب میکنیم. بدین ترتیب، صفحه ای مانند آنچه در زیر مشاهده می کنید، باز خواهد شد. در پایین این قسمت از صفحه در صورت مشاهده شدن عبارت "SNP" به صورت فعال (به گونه ای که بتوان آن را انتخاب کرد و بر روی آن کلیک کرد)، پرایمر طراحی شده مناسب نخواهد بود.

Home Genomes Tables Gene Sorter PCR Session FAQ Help

Human BLAT Results

BLAT Search Results

ACTIONS	QUERY	SCORE	START	END	QSIZE	IDENTITY	CHRO	STRAND	START	END	SPAN
browser details	YourSeq	22	1	22	22	100.0%	13	-	20763784	20763805	22



Integrated DNA Technology (IDT)

IDT یا همان Oligo analyzer، به ما کمک می کند تا تمام ویژگی های پرایمر را از نظر تشکیل self-dimer و hetero-dimer و hair-pin بررسی نماییم. نمای صفحه ی ابتدایی IDT به این شکل است.

IDT INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES
Sign In | My Account
Worldwide
0 Items € 0,00
View Cart
Chat is now closed. Click to email a representative.
Home | Products | Order | Support | Services | SciTools | Search | Go
IDT SciTools OligoAnalyzer 3.1
Instructions | Definitions | Feedback
Sequence | # Bases
5'- | -3'
Target Type: DNA
Oligo Conc: 0.25 µM
Na+ Conc: 50 mM
Mg++ Conc: 0 mM
dNTPs Conc: 0 mM
Analyze | Hairpin | Self-Dimer | Hetero-Dimer | NCBI Blast | TM Mismatch
Clear Sequence | Add To Order | Default Settings

ابتدا توالی یکی از پرایمر ها را در box مربوطه وارد میکنیم.

و گزینه Hair-Pin را انتخاب می کنیم. و پس از submit کردن، دما های ارائه شده را بررسی می کنیم.

دمای پایین تر از ۴۰ درجه معمولا اشکالی به وجود نمی آورد.

General Information

CLICK TO VIEW DOT PLOT

Sequence Name: 23 Base Oligo
Batch Date: 1/17/2011
Sequence :
CAGGCTGTTGTATGTGTTGAATG

ADD TO ORDER

Structure 1

CLICK TO ENLARGE

ΔG 0.23 kcal.mole^{-1}
TM 20.8 °C
ΔH -15.8 kcal.mole^{-1}
ΔS -53.75 cal.K^{-1}mole^{-1}

CONNECTIVITY

DETAILS

جهت بررسی تشکیل شدن self-Dimer ، به Delta G توجه می کنیم. Delta G تا 9.5- تداخلی با انجام صحیح PCR ایجاد نخواهد کرد. اما Delta G های منفی تر معمولا مشکل ساز خواهند بود.

Dimer Sequence

```
5'- CAGGCTGTTGTATGTGTTGAATG -3'
```

Maximum Delta G -39.77 kcal/mole

Delta G -3.55 kcal/mole
Base Pairs 3

```
5'                 CAGGCTGTTGTATGTGTTGAATG
                   ||| :::
3' GTAAGTTGTGTATGTTGTCGGAC
```

Delta G -3.14 kcal/mole
Base Pairs 2

```
5'                 CAGGCTGTTGTATGTGTTGAATG
                      ||
3' GTAAGTTGTGTATGTTGTCGGAC
```

جهت بررسی تشکیل Hetero-Dimer ، توالی پرایمر دیگر را در محل مربوطه وارد می کنیم. و باز به Delta G های آن توجه می کنیم که اگر 9.5- و مثبت تر باشد، مناسب است.

Results | 5' mods | Internal Mods | 3' mods | Mixed Bases

HETERO-DIMER ANALYSIS

Primary Sequence:

5'- CAGGCTGTTGTATGTGTTGAATG -3'

Secondary Sequence:

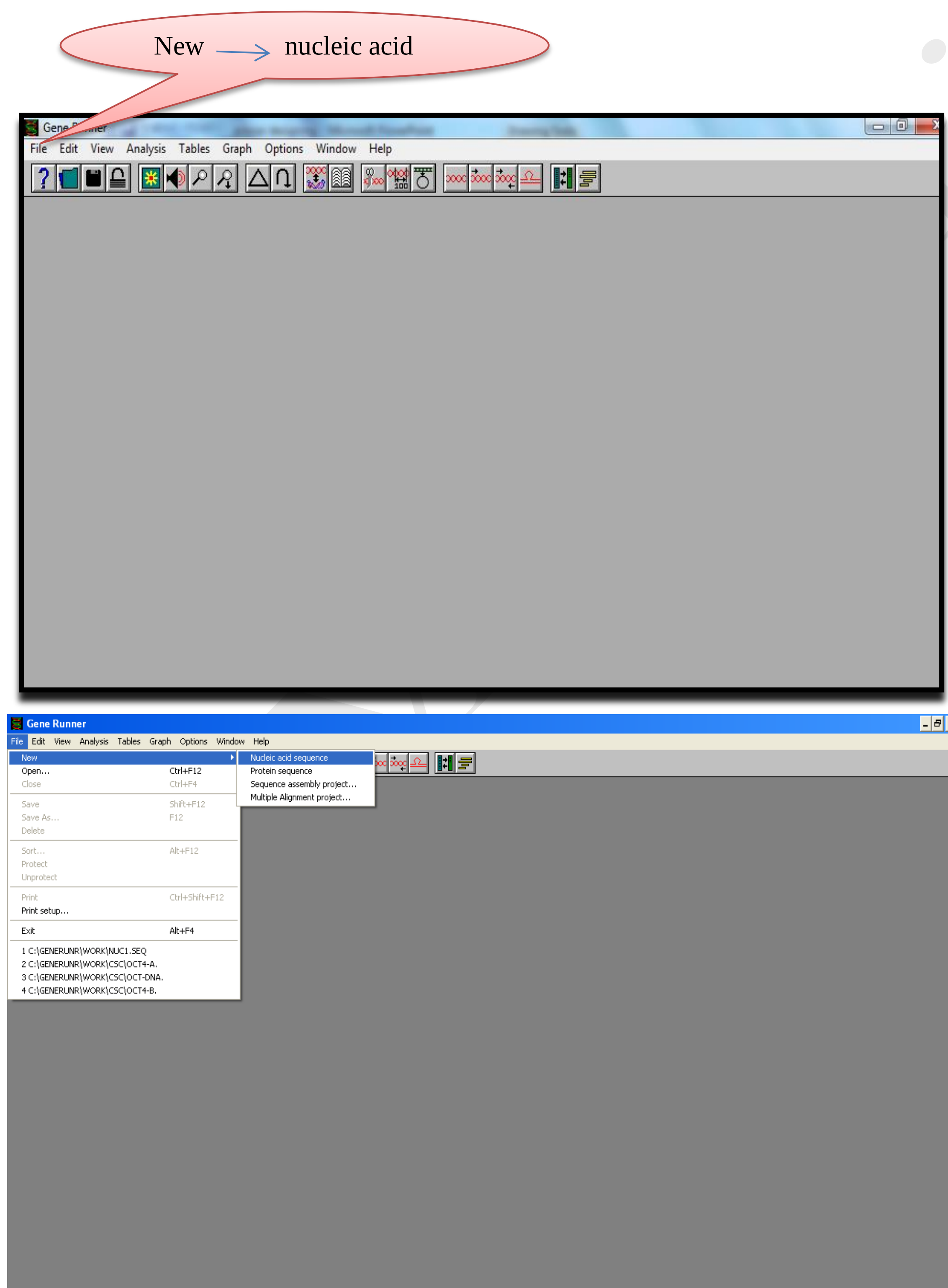
5'- -3'

Create Complement

Calculate

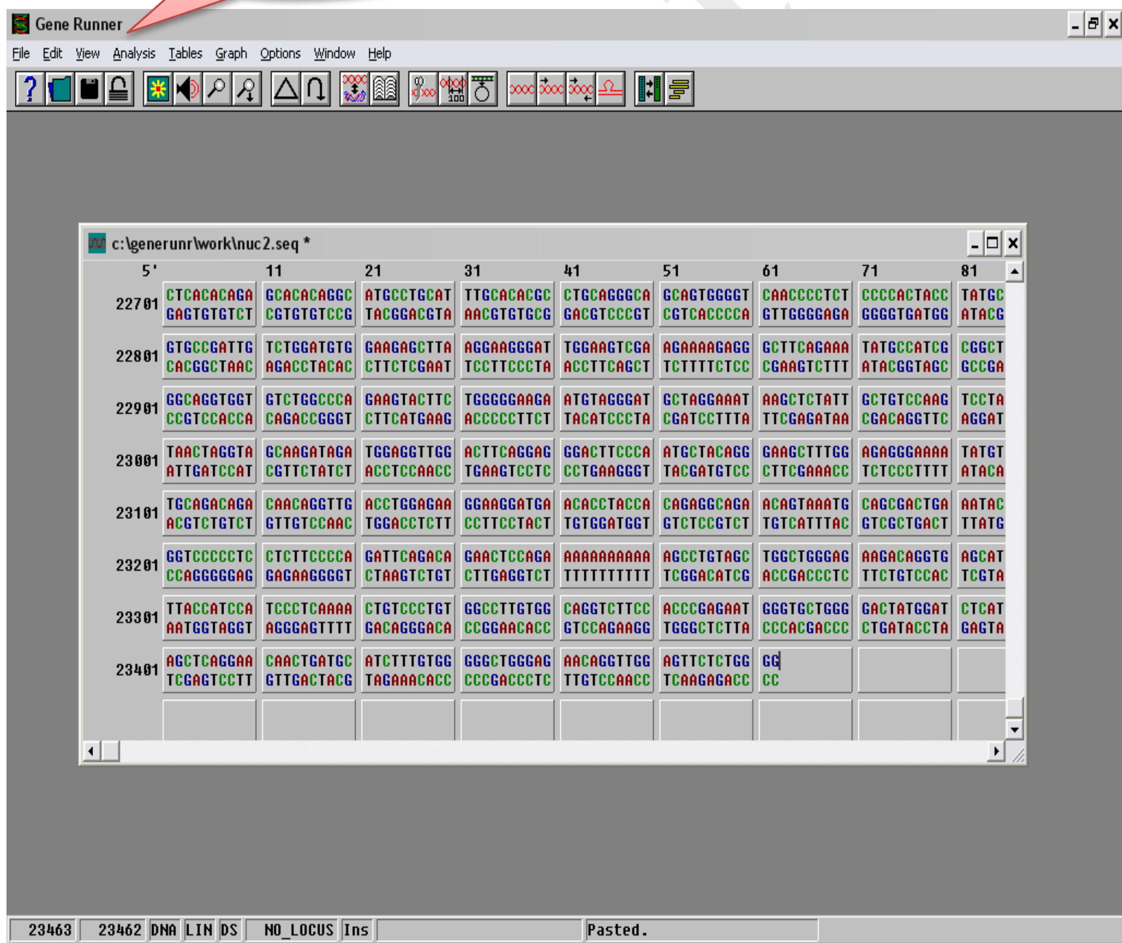
طراحی پرایمر با نرم افزار Gene Runner

با این نرم افزار نیز می توانیم به راحتی با مسیری که در شکل زیر نشان داده شده ویژگی های یک پرایمر را از نظر تشکیل self-dimer و hetero-dimer و hair-pin چک کرد.و همین طور با کپی کردن توالی به دست آمده از پایگاه های اطلاعات داده ها مانند NCBI می توان پرایمر طراحی کرد.





Gene Runner
File Edit View Analysis Tables Graph Options Window Help
c:\generunr\work\nuc2.seq
کپی توالی به دست آمده
از NCBI
1 0 DNA LIN DS NO_LOCUS Ins



PCR primers
Gene Runner
File Edit View Analysis Tables Graph Options Window Help
c:\generunr\work\nuc2.seq *
23463 23462 DNA LIN DS NO_LOCUS Ins Pasted.

Gene Runner - [c:\generunr\work\csc\b2m.]

File Edit View Analysis Tables Graph Options Window Help

	5'	11	21	31	41	51	61	71	81	91
1	AATATAAGTG TTATATTCAC	GAGGCGTCGC CTCCGCAGCG	GCTGGCGGGC CGACCGCCCG	ATTCCTGAAG TAAGGACTTC	CTGACAGCAT GACTGTCGTA	TCGGGCCGAG AGCCCGGCTC	ATGTCTCGCT TACAGAGCGA	CCGTGGCCTT GGCACCGGAA	AGCTGTGCTC TCGACACGAG	GCGCTACTCT CGCGATGAGA
101	CTCTTTCTGG GAGAAAGACC	CCTGGAGGCT GGACCTCCGA	ATCCAGCGTA TAGGTCGCAT	CTCCAAAGAT GAGGTTTCTA	TCAGGTTTAC AGTCCAAATG	TCACGTCATC AGTGCAGTAG	CAGCAGAGAA GTCGTCTCTT	TGGAAAGTCA ACCTTTCAGT	AATTTCCTGA TTAAAGGACT	ATTGCTATGT TAACGATACA
201	GTCTGGGTTT CAGACCCAAA	CATCCATCCG GTAGGTAGGC	ACATTGAAGT TGTAACTTCA	TGACTTACTG ACTGAATGAC	AAGAATGGAG TTCTTACCTC	AGAGAATTGA TCTCTTAACT	AAAAGTGGAG TTTTCACCTC	CATTCAGACT GTAAGTCTGA	TGTCTTTCAG ACAGAAAGTC	CAAGGACTGG GTTCCTGACC
301	TCTTTCTATC AGAAAGATAG	TCTTGTACTA AGAACATGAT	CACTGAATTC GTGACTTAAG	ACCCCCACTG TGGGGGTGAC	AAAAAGATGA TTTTTCTACT	GTATGCCTGC CATACGGACG	CGTGTGAACC GCACACTTGG	ATGTGACTTT TACACTGAAA	GTCACAGCCC CAGTGTCGGG	AAGATAGTTA TTCTATCAAT
401	AGTGGGATCG TCACCCTAGC	AGACATGTAA TCTGTACATT	GCAGCATCAT CGTCGTAGTA	GGAGGTTTGA CCTCCAAACT	AGATGCCGCA TCTACGGCGT	TTTGGATTGG AAACCTAACC	ATGAATTCCA TACTTAAGGT	AATTCTGCTT TTAAGACGAA	GCTTGCTTTT CGAACGAAAA	TAATATTGAT ATTATAACTA
501	ATGCTTATAC TACGAATATG	ACTTACACTT TGAATGTGAA	TATGCACAAA ATACGTGTTT	ATGTAGGGTT TACATCCCAA	ATAATAATGT TATTATTACA	TAACATGGAC ATTGTACCTG	ATGATCTTCT TACTAGAAGA	TTATAATTCT AATATTAAGA	ACTTTGAGTG TGAAACTCAC	CTGTCTCCAT GACAGAGGTA
601	GTTTGATGTA CAAACTACAT	TCTGAGCAGG AGACTCGTCC	TTGCTCCACA AACGAGGTGT	GGTAGCTCTA CCATCGAGAT	GGAGGGCTGG CCTCCCGACC	CAACTTAGAG GTTGAATCTC	GTGGGGAGCA CACCCCTCGT	GAGAATTCTC CTCTTAAGAG	TTATCCAACA AATAGGTTGT	TCAACATCTT AGTTGTAGAA
701	GGTCAGATTT CCAGTCTAAA	GAACTCTTCA CTTGAGAAGT	ATCTCTTGCA TAGAGAACGT	CTCAAAGCTT GAGTTTCGAA	GTTAAGATAG CAATTCTATC	TTAAGCGTGC AATTCGCACG	ATAAGTTAAC TATTCAATTG	TTCCAATTTA AAGGTTAAAT	CATACTCTGC GTATGAGACG	TTAGAATTTG AATCTTAAAC
801	GGGGAAAATT CCCCTTTTAA	TAGAAATATA ATCTTTATAT	ATTGACAGGA TAACTGTCCT	TTATTGGAAA AATAACCTTT	TTTGTTATAA AAACAATATT	TGAATGAAAC ACTTACTTTG	ATTTTGTCAT TAAAACAGTA	ATAAGATTCA TATTCTAAGT	TATTTACTTC ATAAATGAAG	TTATACATTT AATATGTAAA
901	GATAAAGTAA CTATTTCATT	GGCATGGTTG CCGTACCAAC	TGGTTAATCT ACCAATTAGA	GGTTTATTTT CCAAATAAAA	TGTTCCACAA ACAAGGTGTT	GTTAAATAAA CAATTTATTT	TCATAAAACT AGTATTTTGA	TGATGTGTTA ACTACACAAT	TCTCTTA AGAGAAT	

PCR Analysis

طول پرایمرها

محتوای GC پرایمرها

Primer parameters:
- ☑ Shortest primers only
- Primer length >= 18
- Primer length <= 22
- Primer Tm >= 40.0
- Primer Tm <= 65.0
- Primer Tm dif <= 5.0
- Primer %GC >= 35.0
- Primer %GC <= 60.0
- 3' Nucleotides: S
- dG Temp: 25.0
- Probe C. [pMol]: 250.0
- Salt con [mMol]: 50.0
- 3' end dG >= -9.0
- 3' end dG <= -3.0
- 3' end length: 7

Search region:
- From base #: 1
- To base #: END

Product:
- Product length >= 400
- Product length <= 600
- Product Tm >= 70.0
- Product Tm <= 90.0
- Product %GC >= 24.7
- Product %GC <= 73.5
- Optimal Tm >= 45.0
- Optimal Tm <= 75.0

☐ Product must include region:
From: - To: -

Discard primers with:
- ☑ Hairpin loops stem >= 3
- Hairpin loop dG <= -1.0
- ☑ Dimers with dG <= -10.0
- ☑ Primer-primer complementarity
- ☑ 3'end dimers w/dG<= -3.0
- ☑ Primer-3'end complementarity
- ☑ Palindromes >= 8
- ☑ Base runs >= 4
- ☑ Non-unique 3' end

- ◉ Sense 5' ext: 0
- ○ A-Sns 5' ext: 0
- RE sequences: NONE
- ☐ All sense combinations ☐ All antisense combinations

OK | CANCEL | HELP | Primers | Defaults

Gene Runner

File Edit View Analysis Tables Graph Options Window Help

c:\generunr\work\nuc1.seq *

c:\generunr\work\nuc1.pcr

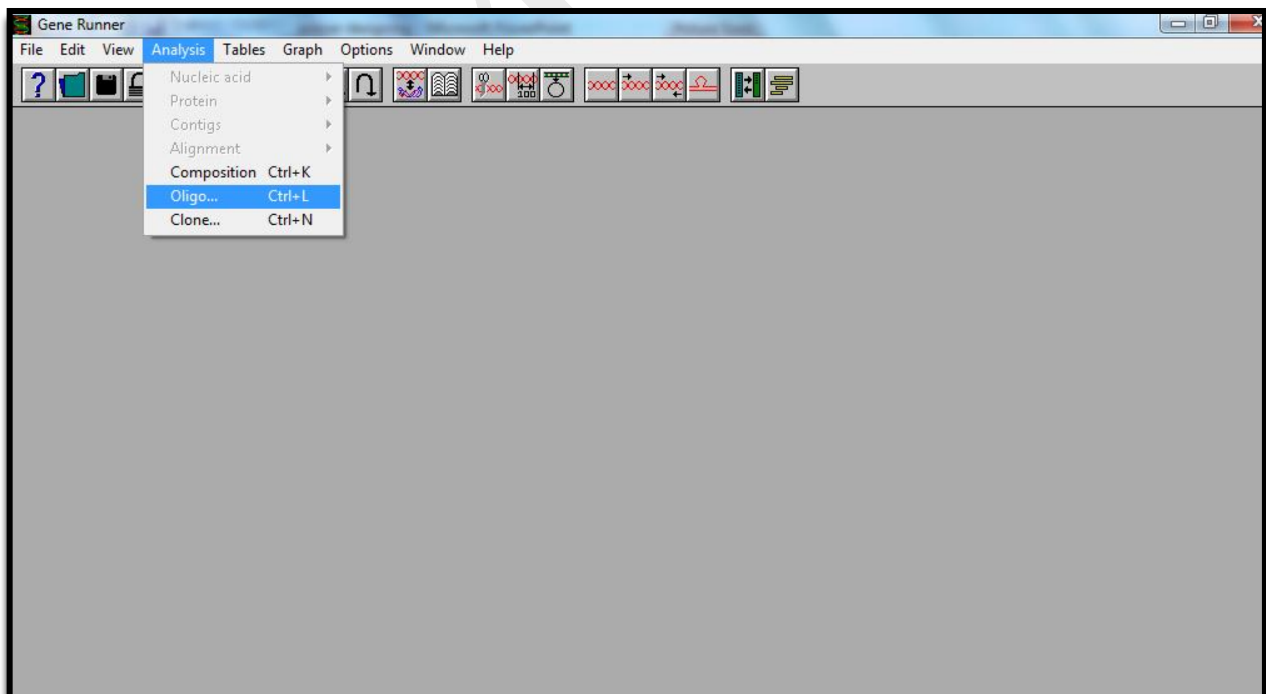
SORT | ANALYZE | SELECT | SEL ALL | DELETE | FILTERS | OLIGOS | TO | CREATE

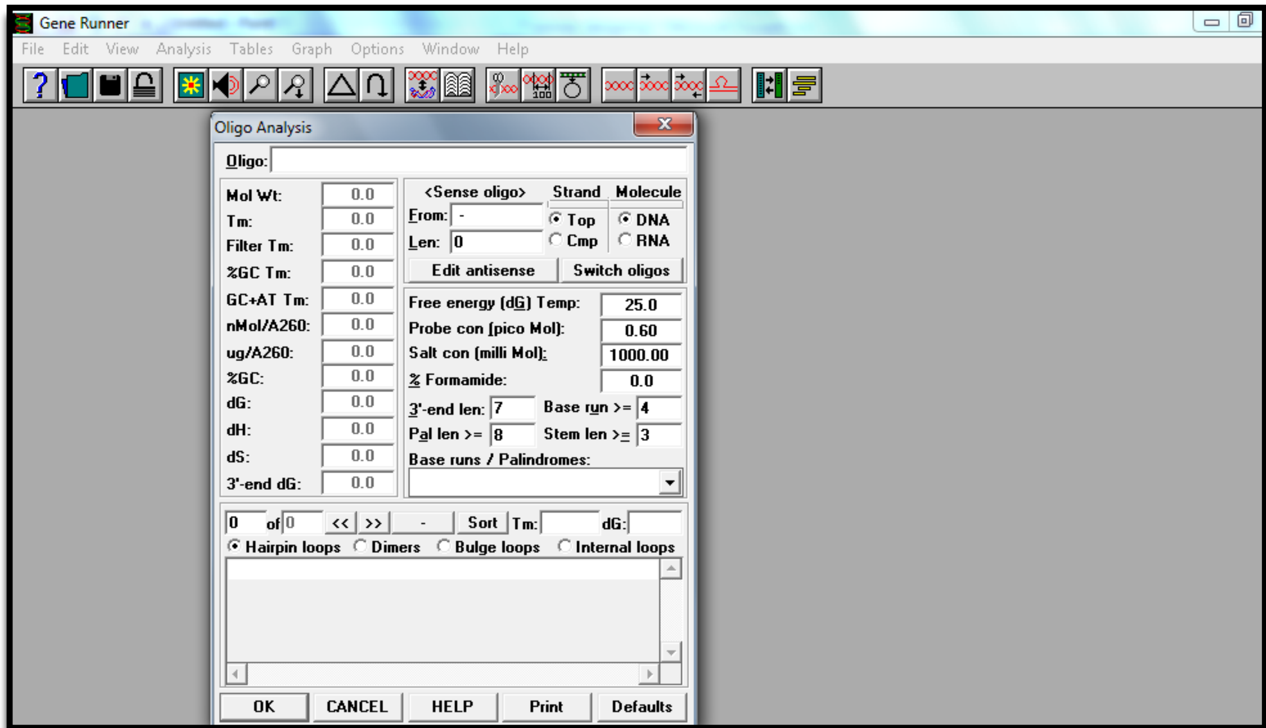
Prod#	Start	Stop	Length	Prod-GC	Prod-Tm	Tm-Dif	Opt-Tm	Sns-Tm	ASn-T	s-GC	ASn-GC	S-3'dG	A-3
1	1173	1572	400	62.0	83.6	1.7	55.7	40.3	[illegible]	38.1	38.9	-4.2	
	ATGTCACTTGGAGTAAGTTAG	21	-27.6	-144.7	-385.2	ACGAATAAATCGATGCTC	18	-27.6	-136.5	-358			
* 2	4994	5393	400	45.5	76.9	1.7	51.3	42.9	41.3	50.0	45.0	-5.1	
	CCCAGGTAATGTGATGTG	18	-26.7	-127.2	-330.0	TTGTACCCTAGTGGCTATAC	20	-28.2	-146.8	-390			
3	5142	5541	400	35.2	72.7	2.2	48.3	41.0	43.2	38.1	50.0	-5.1	
	TTATCTACACCCTACAATGTC	21	-28.0	-145.6	-387.0	GGTATCAGCTATCATGCG	18	-27.6	-133.6	-348			
4	6385	6784	400	43.5	76.1	0.6	50.7	42.0	41.4	47.6	44.4	-5.5	
	GACAGAGTGAGACTCCATATC	21	-27.6	-135.9	-356.9	ACAGATGGATCACGTTTC	18	-26.1	-125.4	-326			
5	6605	7004	400	46.2	77.2	0.3	52.5	44.9	44.7	36.4	47.4	-4.9	
	AAAGCTCCTGTTACATATAAGG	22	-32.0	-166.1	-442.3	TCTTGCAGTCACCCTTAAC	19	-28.5	-137.9	-359			
6	6907	7306	400	54.5	80.6	2.6	56.1	51.2	48.5	45.5	52.6	-4.9	
	AAGGTGTTGACAAGCAGTTCAG	22	-33.1	-155.9	-404.0	ACGCAGCATTGAGTACAGC	19	-30.1	-140.6	-362			
7	6908	7307	400	54.8	80.7	2.5	56.4	49.3	51.8	47.6	55.0	-4.9	
	AGGTGTTGACAAGCAGTTCAG	21	-31.2	-146.8	-380.0	CACGCAGCATTGAGTACAGC	20	-32.0	-146.4	-375			
8	8360	8759	400	51.5	79.3	0.2	54.9	47.7	47.5	45.5	45.5	-7.6	
	CTATGTTCCTAATCAGAGTGGC	22	-32.4	-158.9	-417.3	GATACAGCAGGGATCTTGTTAC	22	-32.1	-157.6	-413			
9	10175	10574	400	46.8	77.4	2.9	51.5	43.6	40.6	55.6	35.0	-6.9	
	CTGTCTTCCCATCCCTAG	18	-28.0	-133.8	-348.8	TGTGCTTTACACATAACAAC	20	-26.6	-137.4	-363			
10	10953	11352	400	48.5	78.1	4.5	52.7	47.6	43.1	55.6	50.0	-5.4	

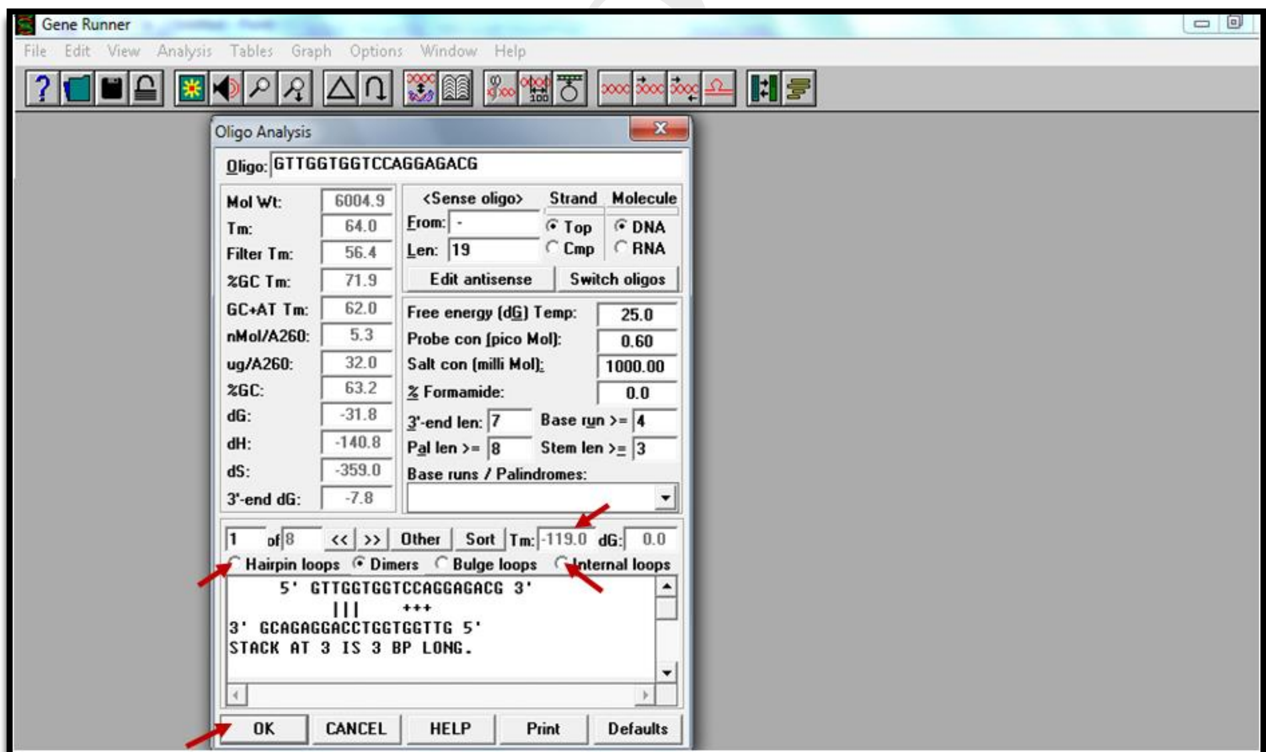
2 | 4994 | 1-1 Reg | 1-1 Prod Reg | LIN | 4000 Products | 1230 Sense | 1150 AntiSense

پرایمر های طراحی شده
توسط برنامه Gene
Runer

چک کردن ویژگی های یک پرایمر از نظر تشکیل **self-dimer** و **hetero-dimer** و **hair-pin** و غیره:




Gene Runner
File Edit View Analysis Tables Graph Options Window Help
Oligo Analysis
Oligo:
Mol Wt: 0.0
Tm: 0.0
Filter Tm: 0.0
%GC Tm: 0.0
GC+AT Tm: 0.0
nMol/A260: 0.0
ug/A260: 0.0
%GC: 0.0
dG: 0.0
dH: 0.0
dS: 0.0
3'-end dG: 0.0
<Sense oligo>
Strand
Molecule
From: -
Len: 0
Top
Cmp
DNA
RNA
Edit antisense
Switch oligos
Free energy (dG) Temp: 25.0
Probe con (pico Mol): 0.60
Salt con (milli Mol): 1000.00
% Formamide: 0.0
3'-end len: 7
Base run >= 4
Pal len >= 8
Stem len >= 3
Base runs / Palindromes:
0 of 0 << >> - Sort Tm: dG:
Hairpin loops
Dimers
Bulge loops
Internal loops
OK
CANCEL
HELP
Print
Defaults


Gene Runner
File Edit View Analysis Tables Graph Options Window Help
Oligo Analysis
Oligo: GTTGGTGGTCCAGGAGACG
Mol Wt: 6004.9
Tm: 64.0
Filter Tm: 56.4
%GC Tm: 71.9
GC+AT Tm: 62.0
nMol/A260: 5.3
ug/A260: 32.0
%GC: 63.2
dG: -31.8
dH: -140.8
dS: -359.0
3'-end dG: -7.8
<Sense oligo>
Strand
Molecule
From: -
Len: 19
Top
Cmp
DNA
RNA
Edit antisense
Switch oligos
Free energy (dG) Temp: 25.0
Probe con (pico Mol): 0.60
Salt con (milli Mol): 1000.00
% Formamide: 0.0
3'-end len: 7
Base run >= 4
Pal len >= 8
Stem len >= 3
Base runs / Palindromes:
1 of 8 << >> Other Sort Tm: -119.0 dG: 0.0
Hairpin loops
Dimers
Bulge loops
Internal loops
5' GTTGGTGGTCCAGGAGACG 3'
||| +++
3' GCAGAGGACCTGGTGGTTG 5'
STACK AT 3 IS 3 BP LONG.
OK
CANCEL
HELP
Print
Defaults

```
Gene Runner
File  Edit  View  Analysis  Tables  Graph  Options  Window  Help

c:\generunr\work\csc\c-myc.
      5'         11         21         31         41         51         61         71         81         91
   1  GACCCCCGAG CTGTGCTGCT CGCGGCCGCC ACCGCCGGGC CCCGGCCGTC CCTGGCTCCC CTCCTGCCTC GAGAAGGGCA GGGCTTCTCA GAGGCTTGGC
      CTGGGGGCTC GACACGACGA GCGCCGGCGG TGGCGGCCCG GGGCCGGCAG GGACCGAGGG GAGGACGGAG CTCTTCCCGT CCCGAAGAGT CTCCGAACCG
 101  GGGAAAAAGA ACGGAGGGAG GGATCGCGCT GAGTATAAAA GCCGGTTTTC GGGGCTTTAT CTAACTCGCT GTAGTAATTC CAGCGAGAGG CAGAGGGAGC
      CCCTTTTTCT TGCCTC …                                            TA GATTGAGCGA CATCATTAAG GTCGCTCTCC GTCTCCCTCG
 201  GAGCGGGCGG CCGGCT …  CT GGGAAGGGAG ATCCGGAGCG AATAGGGGGC TTCGCCTCTG
      CTCGCCCGCC GGCCGA …  GA CCCTTCCCTC TAGGCCTCGC TTATCCCCCG AAGCGGAGAC
 301  GCCCAGCCCT CCCGCT …  AA CTTTGCCCAT AGCAGCGGGC GGGCACTTTG CACTGGAACT
      CGGGTCGGGA GGGCGA …  TT GAAACGGGTA TCGTCGCCCG CCCGTGAAAC GTGACCTTGA
 401  TACAACACCC GAGCAA …  GG GGACACTTCC CCGCCGCTGC CAGGACCCGC TTCTCTGAAA
      ATGTTGTGGG CTCGTT …  CC CCTGTGAAGG GGCGGCGACG GTCCTGGGCG AAGAGACTTT
 501  GGCTCTCCTT GCAGCT …  CC TCCCGCGACG ATGCCCCTCA ACGTTAGCTT CACCAACAGG
      CCGAGAGGAA CGTCGA …  GG AGGGCGCTGC TACGGGGAGT TGCAATCGAA GTGGTTGTCC
 601  AACTATGACC TCGACT …  AC TTCTACCAGC AGCAGCAGCA GAGCGAGCTG CAGCCCCCGG
      TTGATACTGG AGCTGA …  TG AAGATGGTCG TCGTCGTCGT CTCGCTCGAC GTCGGGGGCC
 701  CGCCCAGCGA GGATAT …  TA GCCGCCGCTC CGGGCTCTGC TCGCCCTCCT ACGTTGCGGT
      GCGGGTCGCT CCTATA …  AT CGGCGGCGAG GCCCGAGACG AGCGGGAGGA TGCAACGCCA
 801  CACACCCTTC TCCCTT …  GA CCAGCTGGAG ATGGTGACCG AGCTGCTGGG AGGAGACATG
      GTGTGGGAAG AGGGAA …  CT GGTCGACCTC TACCACTGGC TCGACGACCC TCCTCTGTAC
 901  GTGAACCAGA GTTTCA …  TC CAGGACTGTA TGTGGAGCGG CTTCTCGGCC GCCGCCAAGC
      CACTTGGTCT CAAAGT …  AG GTCCTGACAT ACACCTCGCC GAAGAGCCGG CGGCGGTTCG

Oligo Analysis
Oligo: GCGGCCGCCACCGCCGGGCCCCGGCCGTC
Mol Wt:        8883.8     <Sense oligo>   Strand    Molecule
Tm:            105.9      From: 22        (•) Top   (•) DNA
Filter Tm:     98.3       Len: 29         ( ) Cmp   ( ) RNA
%GC Tm:        96.4       Edit antisense   Switch oligos
GC+AT Tm:      100.0      Free energy (dG) Temp:       25.0
nMol/A260:     4.1        Probe con (pico Mol):        0.60
ug/A260:       36.2       Salt con (milli Mol):        1000.00
%GC:           93.1       % Formamide:                 0.0
dG:            -78.5      3'-end len: 7    Base run >= 4
dH:            -294.4     Pal len >= 8     Stem len >= 3
dS:            -718.0     Base runs / Palindromes:
3'-end dG:     -10.8      R  1  19   4  CCCC
1  of 18   <<  >>   -   Sort   Tm: 99.8   dG: -10.9
(•) Hairpin loops  ( ) Dimers  ( ) Bulge loops  ( ) Internal loops
5'  GCGGCCGCCACCGC
      ||||||     ]
3'  CTGCCGGCCCCGGGC
STEM AT 2 IS 6 BP LONG. LOOP = 14.
OK   CANCEL   HELP   Print   Defaults

51 | 2379 DNA LIN DS NO LOCUS | Lok | 22-50 = 29 | 93.1% GC
```

```
Gene Runner
File  Edit  View  Analysis  Tables  Graph  Options  Window  Help

c:\generunr\work\csc\b2m.
      5'         11         21         31         41         51         61         71         81         91
   1  AATATAAGTG GAGGCGTCGC GCTGGCGGGC ATTCCTGAAG CTGACAGCAT TCGGGCCGAG ATGTCTCGCT CCGTGGCCTT AGCTGTGCTC GCGCTACTCT
      TTATATTCAC CTCCGCAGCG CGACCGCCCG TAAGGACTTC GACTGTCGTA AGCCCGGCTC TACAGAGCGA GGCACCGGAA TCGACACGAG CGCGATGAGA
 101  CTCTTTCTGG CCTGGAGGCT ATCCAGCGTA CTCCAAAGAT TCAGGTTTAC TCACGTCATC CAGCAGAGAA TGGAAAGTCA AATTTCCTGA ATTGCTATGT
      GAGAAAGACC GGACCTCCGA TAG …  CTCTT ACCTTTCAGT TTAAAGGACT TAACGATACA
 201  GTCTGGGTTT CATCCATCCG ACA …  TGGAG CATTCAGACT TGTCTTTCAG CAAGGACTGG
      CAGACCCAAA GTAGGTAGGC TGT …  ACCTC GTAAGTCTGA ACAGAAAGTC GTTCCTGACC
 301  TCTTTCTATC TCTTGTACTA CAC …  GAACC ATGTGACTTT GTCACAGCCC AAGATAGTTA
      AGAAAGATAG AGAACATGAT GTG …  CTTGG TACACTGAAA CAGTGTCGGG TTCTATCAAT
 401  AGTGGGATCG AGACATGTAA GCA …  TTCCA AATTCTGCTT GCTTGCTTTT TAATATTGAT
      TCACCCTAGC TCTGTACATT CGT …  AAGGT TTAAGACGAA CGAACGAAAA ATTATAACTA
 501  ATGCTTATAC ACTTACACTT TAT …  CTTCT TTATAATTCT ACTTTGAGTG CTGTCTCCAT
      TACGAATATG TGAATGTGAA ATA …  GAAGA AATATTAAGA TGAAACTCAC GACAGAGGTA
 601  GTTTGATGTA TCTGAGCAGG TTG …  GAGCA GAGAATTCTC TTATCCAACA TCAACATCTT
      CAAACTACAT AGACTCGTCC AAC …  CTCGT CTCTTAAGAG AATAGGTTGT AGTTGTAGAA
 701  GGTCAGATTT GAACTCTTCA ATC …  TTAAC TTCCAATTTA CATACTCTGC TTAGAATTTG
      CCAGTCTAAA CTTGAGAAGT TAG …  AATTG AAGGTTAAAT GTATGAGACG AATCTTAAAC
 801  GGGGAAAATT TAGAAATATA ATT …  GTCAT ATAAGATTCA TATTTACTTC TTATACATTT
      CCCCTTTTAA ATCTTTATAT TAA …  CAGTA TATTCTAAGT ATAAATGAAG AATATGTAAA
 901  GATAAAGTAA GGCATGGTTG TGG …  AAACT TGATGTGTTA TCTCTTA
      CTATTTCATT CCGTACCAAC ACC …  TTTGA ACTACACAAT AGAGAAT

Oligo Analysis
Oligo: TTCCTGAAGCTGACAGCATTC
Mol Wt:        6461.2     <Sense oligo>   Strand    Molecule
Tm:            64.4       From: -         (•) Top   (•) DNA
Filter Tm:     56.8       Len: 21         ( ) Cmp   ( ) RNA
%GC Tm:        68.9       Edit antisense   Switch oligos
GC+AT Tm:      62.0       Free energy (dG) Temp:       25.0
nMol/A260:     5.1        Probe con (pico Mol):        0.60
ug/A260:       33.2       Salt con (milli Mol):        1000.00
%GC:           47.6       % Formamide:                 0.0
dG:            -33.2      3'-end len: 7    Base run >= 4
dH:            -152.4     Pal len >= 8     Stem len >= 3
dS:            -392.8     Base runs / Palindromes:
3'-end dG:     -6.6
1  of 3   <<  >>   -   Sort   Tm: 8.7   dG: 0.6
(•) Hairpin loops  ( ) Dimers  ( ) Bulge loops  ( ) Internal loops
5'  TTCCTGAAG
       |||   C
3'  CTTACGACAGT
STEM AT 4 IS 3 BP LONG. LOOP = 7.
OK   CANCEL   HELP   Print   Defaults
```

Gene Runner - [c:\generunr\work\csc\b2m.]

File Edit View Analysis Tables Graph Options Window Help

```
     5'         11         21         31         41         51         61         71         81         91
  1  AATATAAGTG GAGGCGTCGC GCTGGCGGGC ATTCCTGAAG CTGACAGCAT TCGGGCCGAG ATGTCTCGCT CCGTGGCCTT AGCTGTGCTC GCGCTACTCT
     TTATATTCAC CTCCGCAGCG CGACCGCCCG TAAGGACTTC GACTGTCGTA AGCCCGGCTC TACAGAGCGA GGCACCGGAA TCGACACGAG CGCGATGAGA
101  CTCTTTCTGG CCTGGAGGCT ATCCAGCGTA CTCCAAAGAT TCAGGT                                       GA ATTGCTATGT
     GAGAAAGACC GGACCTCCGA TAGGTCGCAT GAGGTTTCTA AGTCCA                                       CT TAACGATACA
201  GTCTGGGTTT CATCCATCCG ACATTGAAGT TGACTTACTG AAGAAT                                       AG CAAGGACTGG
     CAGACCCAAA GTAGGTAGGC TGTAACTTCA ACTGAATGAC TTCTTA                                       TC GTTCCTGACC
301  TCTTTCTATC TCTTGTACTA CACTGAATTC ACCCCCACTG AAAAAG                                       CC AAGATAGTTA
     AGAAAGATAG AGAACATGAT GTGACTTAAG TGGGGGTGAC TTTTTC                                       GG TTCTATCAAT
401  AGTGGGATCG AGACATGTAA GCAGCATCAT GGAGGTTTGA AGATGC                                       TT TAATATTGAT
     TCACCCTAGC TCTGTACATT CGTCGTAGTA CCTCCAAACT TCTACG                                       AA ATTATAACTA
501  ATGCTTATAC ACTTACACTT TATGCACAAA ATGTAGGGTT ATAATA                                       TG CTGTCTCCAT
     TACGAATATG TGAATGTGAA ATACGTGTTT TACATCCCAA TATTAT                                       AC GACAGAGGTA
601  GTTTGATGTA TCTGAGCAGG TTGCTCCACA GGTAGCTCTA GGAGGG                                       CA TCAACATCTT
     CAAACTACAT AGACTCGTCC AACGAGGTGT CCATCGAGAT CCTCCC                                       GT AGTTGTAGAA
701  GGTCAGATTT GAACTCTTCA ATCTCTTGCA CTCAAAGCTT GTTAAG                                       GC TTAGAATTTG
     CCAGTCTAAA CTTGAGAAGT TAGAGAACGT GAGTTTCGAA CAATTC                                       CG AATCTTAAAC
801  GGGGAAAATT TAGAAATATA ATTGACAGGA TTATTGGAAA TTTGTT                                       TC TTATACATTT
     CCCCTTTTAA ATCTTTATAT TAACTGTCCT AATAACCTTT AAACAA                                       AG AATATGTAAA
901  GATAAAGTAA GGCATGGTTG TGGTTAATCT GGTTTATTTT TGTTCC
     CTATTTCATT CCGTACCAAC ACCAATTAGA CCAAATAAAA ACAAGG
```

Oligo Analysis

Oligo: TAGAGCTACCTGTGGAGCAAC

Mol Wt:	6535.3
Tm:	61.4
Filter Tm:	53.8
%GC Tm:	70.8
GC+AT Tm:	64.0
nMol/A260:	4.9
ug/A260:	31.7
%GC:	52.4
dG:	-31.9
dH:	-152.4
dS:	-396.8
3'-end dG:	-6.4

<Sense oligo> Strand Molecule

From: - ○ Top ◉ DNA

Len: 21 ◉ Cmp ○ RNA

Edit antisense Switch oligos

Free energy (dG) Temp: 25.0

Probe con (pico Mol): 0.60

Salt con (milli Mol): 1000.00

% Formamide: 0.0

3'-end len: 7 Base run >= 4

Pal len >= 8 Stem len >= 3

Base runs / Palindromes:

1 of 1 << >> - Sort Tm: 38.4 dG: -0.6

◉ Hairpin loops ○ Dimers ○ Bulge loops ○ Internal loops

```
5'  TAGAGCTACCT
       |||    ]
3'  CAACGAGGTG
STEM AT 5 IS 3 BP LONG. LOOP = 8.
```

OK CANCEL HELP Print Defaults

آزمایش ۴

ژل الکتروفورز (Gel Electrophoresis)

یکی از پرکاربردترین تکنیک ها در بیولوژی مولکولی الکتروفورز نام دارد که اساس آن بسیار ساده است. لغت فورز به معنای حرکت و تحرک است و الکتروفورز در واقع حرکت ذرات تحت تأثیر میدان الکتریکی را گویند.

در واقع مهاجرت ذرات باردار تحت اثر یک میدان الکتریکی را الکتروفورز گویند.

در این تکنیک مولکول های DNA براساس بار و وزن مولکولی(سایز) آنها جدا می شوند.

به علت باردار بودن ماکرومولکول های زیستی مانند DNA و پروتئین ها می‌توان با قرار دادن آنها در یک میدان الکتریکی، آنها را بر اساس خواص فیزیکی مانند شکل فضایی، وزن مولکولی و بار الکتریکی، تفکیک کرد. برای این منظور از روشی بنام الکتروفورز استفاده می‌شود. روش های مختلف الکتروفورزی برای تفکیک و مطالعه بیومولکول ها اعم از اسید های نوکلئیک یا پروتئین ها ابداع شده است.

در ژل الکتروفورز از یک محیط نیمه جامد (ژل) به عنوان فاز ثابت استفاده می‌شود. این نوع الکتروفورز برحسب نوع ژل به کار گرفته شده به دو نوع الکتروفورز ژل پلی‌اکریل آمید (PAGE) و الکتروفورز ژل آگارز تقسیم می‌شود.

معمولاً برای تفکیک قطعات بزرگ DNA (بزرگ‌تر از ۵۰۰ جفت باز) در صورتیکه هدف صرفاً بررسی کیفی و تفکیک باشد استفاده از ژل آگارز انتخاب اول است. برای تفکیک قطعات کوچک DNA دو رشته‌ای و قطعات DNA تک رشته‌ای از ژل پلی اکریل آمید استفاده می‌شود.

قدرت تفکیک ژل های مزبور با غلظت آنها مرتبط است. برای مثال، برای تفکیک قطعاتی به اندازه ۱۰۰ جفت باز از آگارز ۳٪ و برای قطعات حدود ۲۰۰۰ جفت باز از آگارز ۰/۸ ٪ استفاده می‌شود.

در صورتیکه نیاز به تفکیک DNA به صورت تک رشته‌ای باشد، از مواد واسرشت کننده نظیر اوره، فرمالدهید یا فرمامید در ژل هم‌زمان با الکتروفورز استفاده می‌شود. به این نوع ژل ها، ژل واسرشت کننده می‌گویند. چنین ژل-هائی پیچ و تاب های اسید های نوکلئیک را از هم باز کرده و بنابراین تفکیک مولکول ها فقط براساس طول و نه ساختار دوم انجام می‌شود. در این ژل‌ها مولکول‌های کوچک‌تر در مقایسه با مولکول‌های بزرگ‌تر سریعتر حرکت کرده و مسافت بیشتری را طی می‌کنند.

از روش PAGE برای بررسی جهش‌ها و تعیین توالی DNA ، و مطالعه و بررسی پروتئین ها استفاده می‌شود.

الکتروفورز DNA روی ژل آگارز:

ژل آگارز:

یک ژل پایدار است و قطر روزنه های آن بسیار بزرگ است و برای جداسازی ماکرومولکول ها و سوپر مولکول ها استفاده می شود. از ژل آگارز در الکتروفورز هم به صورت عمودی و هم به صورت افقی می توان استفاده کرد ولی شکل افقی آن رایج تر است. این ژل را در درصدهای مختلف تهیه می کنند که این مطلب به اندازه قطعه موردنظر بستگی دارد. یعنی هرچه اندازهٔ قطعه موردنظر بزرگتر باشد غلظت ژل کاهش می یابد و برحسب اندازه قطعه، ژل آگارز را در cast 30 cc و یا cast 60 cc تهیه می کنند.

- قدرت جداسازی مولکولهای DNA توسط غلظتهای مختلف آگارز

آگارز را می توان برای جدا کردن قطعات DNA با طول ۱۰۰ جفت باز (ژل ۳٪) تا ۵۰۰۰۰ جفت باز (ژل ۰/۴٪) به کار برد. بطور مثال: برای قطعه‌ای با میزان bp ۱۰۰ ، از ژل آگارز ۲/۵٪ استفاده می کنیم در حالیکه برای قطعه (bp) ۱۰۰۰ جفت بازی از ژل آگارز ۱/۵٪ استفاده می کنیم. کمترین درصد ژل آگارز در حدود ۰/۴٪ می باشد.

درصد آگارز	قدرت جداسازي DNA
3	100-1000bp
2	200- 1500bp
1.5	300- 3000bp
1	500 – 5000bp
0.8	1000- 7000bp
0.6	10 – 30kbp
0.4	30 – 50kbp

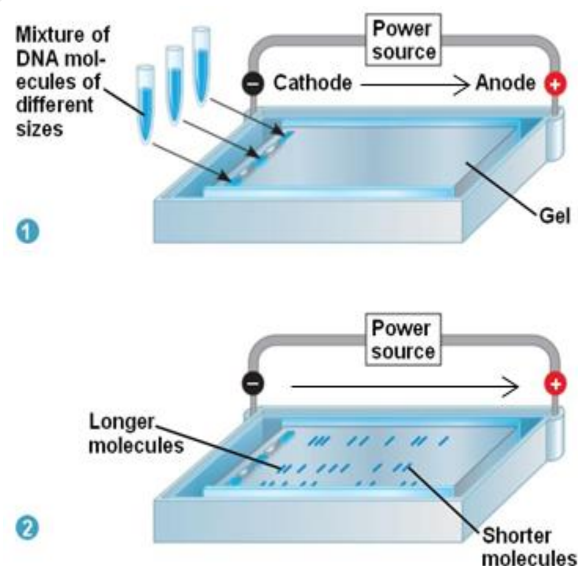
در این روش نمونه DNAی تخلیص شده را همراه با شناساگرهایی (مارکر) که غلظت آنها مشخص است الکتروفورز کرده و با مقایسه باندهای ایجاد شده مربوطه به DNA تخلیص شده با باند مارکر می توان سنجش کیفی DNA را انجام داد. برای این منظور ۵ مایکرولیتر از محلول DNA را به همراه یک میکرولیتر بافر بارگیری (Loading Buffer) بر روی ژل آگار ۰/۸ درصـــد نمونـــه گذاری کرده و الکتروفورز می شود. برای دیدن باند DNA بایستی ژل را به مدت ۵ دقیقه در محلول اتیدیوم بروماید (mg/ml ۰/۵) قرار داده و بعد در زیر نور ماوراء بنفش بر روی دستگاه UV-transiliuminator (Gel Doc) مشاهده کرد (و یا می توان اتیدیوم بروماید را در زمان تهیه به ژن اضافه کرد.)

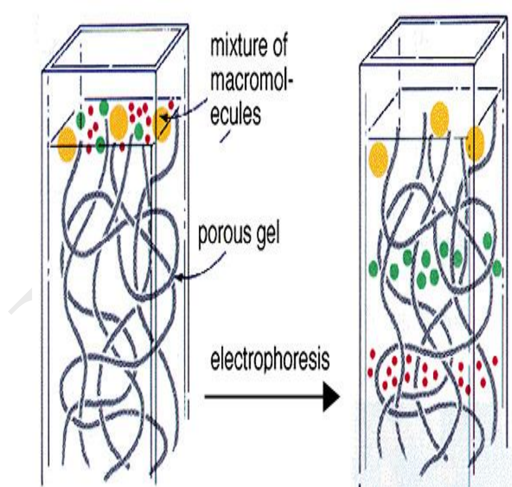
نمای ساده از دستگاه الکتروفورز:

دستگاه الکتروفورز شامل یک محیط خلاء، یک الکترود منفی و یک الکترود مثبت در دو طرف ذره باردار می-باشد. گروه های فسفات روی اسیدهای نوکلئیک دارای بار منفی هستند. بنابراین رشته DNA دارای بار الکتریکی منفی می باشد.

وقتی جریان الکتریکی قطع می باشد ذره موردنظر در میدان الکتریکی ثابت است و زمانی که جریان الکتریکی وصل باشد ذره موردنظر به تنهایی و با سرعت شتابدار تا رسیدن به الکترود مثبت حرکت کرده و برقراری جریان الکتریکی در تانک الکتروفورز همواره از الکترود منفی به سمت الکترود مثبت است. البته این مطلب در مورد رشته DNA که دارای بارالکتریکی منفی است صادق است.

تحرک الکتریکی معیار اصلی سنجش در جداسازی مولکول هاست. جداسازی در این روش بر اساس بار الکتریکی و اندازه مولکولها صورت می گیرد. درواقع تحرک الکتریکی هر ذره وابسته به شکل و اندازه ذره و بار ذره است درحالی که وجود بار باعث زودتر رسیدن ذره به قطب است.همچنین هرچه مولکولها بزرگتر باشند تحرک کمتری داشته و در بالای ژل می مانند و هرچه کوچکتر باشند زودتر به پایین ژل منتقل می‌شوند. وجود ضریب اصطکاک f نیز یک عامل مقاوم برای تحرک است. ضریب اصطکاک کمیتی است که ارتباط مستقیم با اندازه و شکل ذرات دارد هرچه ذره به شکل کروی نزدیکتر باشد ضریب اصطکاک کمتری دارند. هرچه شکل قطعات یا مولکولها از حالت کروی دور باشد ضریب اصطکاک f بیشتری داشته و تحرک الکتریکی کمتری داراست.





پروتکل الکتروفورز DNA روی ژل آگارز (Electrophoresis)

محلول‌ها و بافرهای مورد نیاز برای الکتروفورز آگارز

۱- **پودر آگارز**

۲- **محلول TBE 0.5x**

برای تهیه TBE 0.5X ابتدا طبق دستور زیر محلول stock بافر TBE 10X را ساخته سپس از آن برای هر بار استفاده رقت گیری می نمائیم.

TBE 10x :

108 gr Tris-base + 55gr Boric Acid + 40ml Na_2EDTA 0.5M (PH8)

مقدار 108 gr از Tris-base و 55gr از Boric Acid را در 900 ml آب مقطر حل کرده و مقدار 40ml از Na_2EDTA 0.5M با PH معادل ۸ به آن اضافه می کنیم . سپس حجم محلول را با استفاده از آب مقطر به ۱ لیتر می رسانیم در اینصورت محلول TBE 10X خواهیم داشت.

برای تهیه 500ml بافر TBE 0.5x از استوک TBE 10X چگونه باید عمل کرد؟

۳ - بافر بارگذاری (Loading Buffer)

این بافر شامل دو ماده برموفنل بلو ۰/۰۵ ٪ (برای رنگ) و گلیسرول ۵۰٪ (برای سنگین شدن نمونه ها که در انتهای چاهک قرا بگیرند) و EDTA ۰/۰۵٪ می باشد که با آب مقطر به گونه ای ترکیب می شوند که غلظت های ذکر شده در آنها ثابت بماند. این محلول حاصل در دمای ۴ درجه سانتیگراد یخچال نگهداری شود.

حرکت این رنگ نشان دهنده حرکت نمونه های لود شده در داخل چاهک ها به سمت پایین ژل یا همان قطب مثبت بوده یعنی حرکت آن علاوه بر صحت انجام کار یک شاخص برای اندازه گیری و حرکت نمونه ها در داخل ژل است .

۴- محلول اتیدیوم بروماید (EtBr) 10mg/ ml

۱۰ میلی‌گرم از این محلول را در یک میلی‌لیتر آب مقطر حل می کنیم و برای چند ساعت روی همزن مغناطیسی و زیر هود شیمیایی قرار می دهیم تا کاملاً حل شود. محلول اتیدیوم بروماید نارنجی رنگ بوده در ظرف تیره و دور از نور در دمای اتاق نگهداری شود.

نکته: از آنجا که اتیدیوم بروماید بسیار سمی و به شدت موتاژن می باشد لذا جهت کاهش mutagenicity و به عنوان جایگزینی مناسب برای اتیدیوم بروماید در آزمایشگاه بیولوژی مولکولی از DNA safe stain و یا Gel Red که یک رنگ گیاهی است می‌توان استفاده کرد.

۵. **(Ladder) Marker**

۶. **آب مقطر**

وسایل موردنیاز در الکتروفورز:

۱. دستکش

۲. کست (cast) یا Tray و شانه (comb)

۳. ترازو (Balance)

۴. سمپلر

۵. ماکروویو

۶. تانک الکتروفورز افقی

۷. Power supply (جهت برقراری جریان الکتریکی در تانک الکتروفورز)

۸. دستگاه عکسبرداری تولید کننده نور ماوراءبنفش (Gel Doc)

روش کار:

۱. ابتدا ژل آگارز را تهیه می کنیم. جهت تهیه مثلاً آگارز ۲٪ ، برای حجم ۴۰ سی سی، مقدار ۰/۸ گرم پودر آگارز را وزن کرده در ارلن حاوی۴۰ سی سی بافر TBE 0.5Xمی ریزیم.

۲. محلول داخل ارلن را در داخل ماکروویو قرار داده یا بجوشانید بطوری که ذرات، آگار داخل آن کاملاً حل شده و ذره ای داخل آن نباشد و محلول یکنواخت گردد. در نتیجهٔ حرارت، واحدهای تکرار شونده در آگارز یک شبکه از منافذ با قطر ۸۰ الی ۲۵۰ نانومتر تولید می‌کنند. هرچه غلظت آگارز بالاتر باش منافذ ریزتری را ایجاد می‌کند.

۶. وقتی محلول داخل ارلن خنک شد تا جایی که با گرفتن دست بالای ارلن بخار را احساس نکردیم ، تا قبل از اینکه ژل منعقد گردد و در حالت مایع به آن ۲ ـ ۱ مایکرولیتر ژل رد (Gel Red) اضافه می‌شود.

۷. محلول را تکان دهید تا ژل رد کاملاً در آن حل شده و محلول یکنواخت گردد.

۸. شانه (Comb) را بر روی قالب یا Tray موردنظر قرار دهید و فاصله بین Cast , Comb را mm۱ درنظر گرفته وبراساس این فاصله جایگاه comb بر روی cast را تنظیم کنید. بالا و پایین قالب را با Holder و یا چسب کاملا ببندید تا ژل از آن نشتی نداشته باشد.

۹. سریعا محلول درون ارلن (ژل مایع) را در داخلTray یا همان قالب تانک الکتروفورز می ریزیم. در هنگام ریختن ژل باید دقت کنیم که حباب هوا ایجاد نگردد همچنین باید توجه داشت که سطح قالب کاملاً تراز باشد.

قطر ژل تا ۵ میلی‌متر کافی می‌باشد. درون قالب با استفاده از شانه‌های پلاستیکی (Comb) مخصوص حفراتی ایجاد می‌کنیم که به این حفرات چاهک یا well گفته می شود.

۹. در حدود نیم ساعت صبر کنید تا ژل آگارز بسته شود سپس شانه را به دقت بدون اینکه آسیبی به چاهک ها برسد از داخل ژل خارج کنید آنگاه ژل را به همراه قالب داخل تانک الکتروفورز قرار دهید و جای آن را ثابت کنید، دقت کنید که بالا و پایین قالب برای گذاشتن در تانک باید باز باشد تا جریان از ژل عبورکند و سپس تانک را تا کمی بالاتر از ژل توسط TBE 0.5x پر کنید.



طریقه ران کردن (Running Procedure)

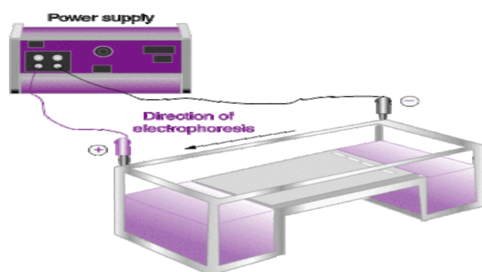
۱. به میکروتیوبهای حاوی نمونه به ازاء هر ۵ مایکرولیتر از نمونه حدود ۱ مایکرولیتر از Loading Buffer اضافه کرده و خوب سمپلینگ کنید.

۲. بوسیله سمپلری که آن را روی ۶ مایکرولیتر تنظیم کرده اید از محتویات درون هر میکروتیوب داخل چاهک ها از سمت چپ به راست از ژل بارگذاری یا Load کنید و در آخرین چاهک نیز مارکر یا Ladder را بار گذاری کنید. هر چاهک مختص یک نمونه است.(نمونه ها را به ترتیب مورد نظر خود بارگذاری کنید چون در انتها باید بدانید که هر چاهک حاوی چه نمونه ای بوده)



۳. ادستگاه مولد برق (Power Supply) را به تانک الکتروفورز متصل می‌کنیم. در این حالت بایستی توجه داشت که جهت حرکت از بالا به پایین و از قطب منفی به مثبت باشد. سپس دستگاه را روشن نموده و بر روی ولتاژ

۱۲۰ ولت تنظیم نموده تا محلول run شده از چاهکها خارج شود و سپس ولتاژ را پائین آورید و در ولتاژ حدوداً ۱۰۰ ولت قرار دهید.



۴. صبر کنید تا رنگ بروموفنل بلو (Loading Dye) یک سوم طول ژل را طی نماید. ژل را از تانک خارج کنید و سپس از قالب نیز خارج کرده و در داخل دستگاه Gel Doc قرار دهید.

۵. پس از قراردادن ژل در داخل دستگاه عکس ژل را بگیرید.

کار دستگاه ژل داک: Gel Cod

۱- ژل را در داخل دستگاه ژل داک قرار داده مانیتور را روشن کرده و از طریق مانیتور محل قرارگرفتن ژل را تنظیم کنید. و درب دستگاه را ببندید.

۲- سپس اشعه uv را روشن کرده تا باندها نمایان شوند.

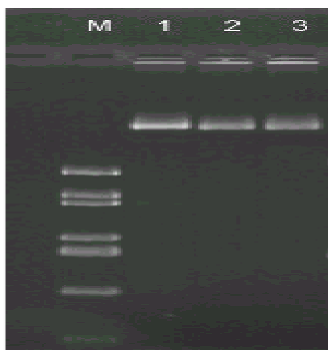
۳- با کلید (+) و (-) نور را زیاد و کم کنید.

۴- وقتی باندها مشخص شد ابتدا کلید save را فشار دهید و سپس کلید print را روی دستگاه printing فشار دهید و عکس ژل را بگیرید.

۵- سپس uv را خاموش کرده و تمام دستگاه ها را نیز خاموش کرده و ژل را از دستگاه Gel Doc خارج نمائید.

نتیجه گیری:

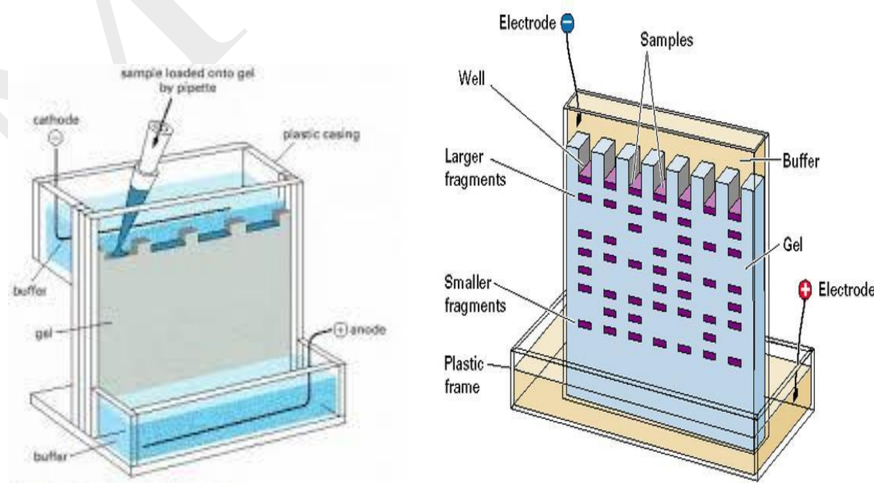
از مقایسه باندها با باندهای دیگر و همچنین مارکر marker و نمونه normal می توان تغییرات و موتانتها را تشخیص داد و یا حتی وجود یا عدم وجود DNA را نیز مشخص کرد. ایجاد باند و تأثیر uv روی آن وجود DNA را ثابت می کند.



Poly Acrylamide Gel Electrophoresis (PAGE)
الکتروفورز با ژل پلی آکریل آمید

انجام عمل الکتروفورز در ژل‌های اکریل‌آمید را به صورت خلاصه با "PAGE" (PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) نمایش می‌دهند. الکتروفورز PAGE دارای قدرت تفکیک بسیار بالائی بوده و برای تفکیک پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک به کار گرفته می‌شود. ژل‌های پلی آکریلامید از پلیمریزه شدن مونومرهای اکریل آمید در حضور مقادیر کمی N و N' متیلن بیس اکریل آمید (به طور خلاصه به آن بیس- اکیل آمید نیز می گویند)تشکیل می شوند. بیس اکریل آمید دو مولکول اکریل آمید است که توسط گروه متیلن به یکدیگر اتصال یافته‌اند. بیس اکریل آمید به صورت نوارهای عرضی این پلیمر را به طور منظم به هم ارتباط می‌دهد طوری که منافذ با قطر معین و یکسان در ژل ایجاد می شود. اندازه روزنه در ژل های اکریل آمید با تغییر غلظت اکریل آمید و بیس اکریل آمید تغییر می‌کند. هر چه غلظت پلی اکریل آمید بیشتر باشد قدرت تفکیک ژل بیشتر خواهد بود و مولکول های دارای وزن مولکولی نزدیک به هم را بهتر تفکیک می‌نماید. البته معمولا برای بررسی کیفی و تفکیک قطعات بزرگ DNA (بزرگ تر از ۴۰۰ جفت باز) از ژل آگارز به عنوان اولین انتخاب استفاده می‌شود، زیرا تهیه ژل مزبور به مراتب سریعتر وآسانتر از ژل پلی اکریل آمید بوده و هزینه کمتری را در بر می‌گیرد. برای تفکیک قطعات کوچک DNA دو رشته ای و قطعات DNA تک رشته ای از ژل پلی اکریل آمید استفاده می شود. به طور کلی از روش PAGE برای بررسی جهش ها و تعیین توالیDNA نیز استفاده می شود.





شکل : نمایی از الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید و ساختمان بیوشیمیایی ژل

ژل های ۳٪ اکریل آمید روزنه های بزرگی دارند و در الکتروفورز پروتئین ها استفاده می شوند. این ژل ها در جداسازی DNA نیز کاربرد دارند.ژل های پلی اکریل آمید برای قطعات ۶ جفت باز (ژل ۳۰٪) و تا ۱۰۰۰ جفت باز (ژل ۳٪) استفاده می شود.

آکریل آمید (%)	جرم مولکولی (kDa)
2/5	در محدوده 1000
5	36–205
7.5	24–205
10	14-205
12.5	14-100
15	14-60
17.5	12-40
20	10-30
30	در محدوده 2

مونومرهای اکریل آمید بسیار سمی هستند و از طریق تماس پوستی و تنفسی جذب شده و باعث ایجاد ضایعات پوستی و حتی تخریب دستگاه عصبی مرکزی می شوند. اما پس از پلی مره شدن نسبتا غیرسمی می شود اما ممکن است درصد کمی از مونومرها هنوز پلیمریزه نشده باشند و بنابر این باید با احتیاط با این ژل کار کرد.
محلول اکریل آمید باید در ۴ درجه سانتیگراد و در تاریکی نگهداری شود تا پایدار بماند.
به منظور بررسی پروتئین ها با استفاده از PAGE، به سبب اینکه پروتئین ها دارای بارهای متفاوت هستند، معمولاً برای اینکه تفکیک فقط براساس وزن مولکولی انجام شود به بافر ماده شیمیائی SDS (سدیم دو دسیل سولفات) اضافه می‌شود که در این حالت به آن SDS-PAGE گفته می شود. SDS مولکول بزرگی با بار منفی می‌باشد. این ماده باعث واسرشت شدن پروتئین ها شده و به آنها متصل می‌شود. به ازای هر دو اسید آمینه، یک مولکول SDS به پروتئین متصل می‌شود که باعث القاء بارمنفی متناسب با وزن مولکولی به پروتئین می‌شود.
پلیمریزاسیون ژل با اضافه کردن آمونیوم پرسولفات (APS) شروع میشود و با افزودن TEMED (ترا متیل اتیلن دی آمین) تسریع میشود. افزایش TEMED یا APS سرعت پلیمریزاسیون را افزایش میدهد. این مواد کاتالیست های پلی مریزه کننده ژن اکریلامید محسوب می شوند.

محلولهای لازم در الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید

۱ـ آکریل آمید: ۳۰٪ : برای تهیه ۱۰۰ میلی‌لیتر از این محلول، gr 29 از پودر آکریل آمید را با gr1 از پودر بیس‌آکریل آمید مخلوط کرده و حجم آنرا با آب مقطر به ۱۰۰ میلی‌لیتر می‌رسانیم.

۲ـ TBE1X

۳ـ آمونیوم پرسولفات ۱۰٪ (APS) : برای تهیه ۱۰ میلی‌لیتر از این محلول، ۱ گرم از پودر APS را با آب مقطر به حجم ۱۰ میلی‌لیتر می‌رسانیم. این محلول را بایستی در یخچال و در دمای 4 ^{o}C نگهداری کرد.

۴ـ TEMED بصورت آماده وجود دارد که این محلول بسیار بوی زننده‌ای داشته و موتاژن می‌باشد. بنابراین هنگام استفاده باید حتما زیر هود کار شود.

۵– بافر لودینگ حاوی فرم آمید: 10ml فرم آمید ، µl200 EDTA 0.5µ با PH 8، 15 mg گزیلن سیانول و 3 mg برومو فنول بلو را مخلوط می کنیم .

وسایل لازم برای الکتروفورز :

۱ـ تانک الکتروفورز عمودی

۲ـ شیشه‌های مخصوص ژل

۳ـ شانه‌های مخصوص برای ایجاد چاهکها در ژل

۴ـ گیره یا holder برای نگهداری شیشه‌های ژل

۵ـ Spacer (فاصله انداز)

طرز تهیه ژل :

در این روش ابتدا شیشه های مورد استفاده جهت تهیه ژل عمودی را با آب مقطر به خوبی شستشو داده و با استفاده از الکل به خوبی تمیز می کنیم . سپس شیشه ها را به شکل عمودی به گونه ای به هم متصل کرده که بین آنها spacer می گذاریم تا فضایی بسیار کم بین دوشیشه جهت ورود ژل ایجاد شود.

سپس محلول آکریل آمید ۸٪ را برای حجم ۳۰ میلی لیتر مطابق زیر تهیه می کنیم:

۸ ml از محلول استوک آکریل آمید۳۰٪ و ۳ ml محلول TBE 10x را مخلوط کرده سپس با آب مقطر حجم آن را به ۳۰ میلی لیتر برسانید، به ۲ ml از این محلول مقدار ۱۰ µl TEMED و ۱۰ مایکرولیتر APS جهت سیل کردن (جلوگیری از نشتی ژل از بین دو شیشه جهت پرکردن شکافهای موجود بین فاصله دهنده ها یا Spacerها) اضافه کنید و به بقیه آن ۳۰۰ µl محلول ۱۰٪ APS (آمونیوم پرسولفات) و ۱۸ مایکرولیتر TEMED را به بقیه محلول افزوده با هم مخلوط کرده سپس محلول را بین شیشه ها ریخته و بلافاصله شانه را درون ژل قرار می-

دهیم . باید دقت داشته باشیم که حباب هوا درون ژل وجود نداشته باشد . پس از بستن ژل شانه و فاصله دهنده پایین را به دقت از درون آن خارج می کنیم و شیشه حاوی ژل را با استفاده از گیره روی تانک محکم می کنیم باید توجه داشته باشیم که در قسمت پایین تانک و در زیر شیشه حباب هوا وجود نداشته باشد . از TBE 1X به عنوان بافر در تانک استفاده می کنیم . قبل از لود کردن چاهک های بدست آمده را با استفاده از سرنگ به خوبی شستشو می دهیم . سپس محصول هضم آنزیم را درون چاله های بدست آمده می ریزیم . در این مرحله مقدار ۵ مایکرولیتر از Loading buffer حاوی فرم آمید را به ۱۰ مایکرولیتر از هر یک از محصولات PCR اضافه می کنیم . پس از مخلوط کردن بافر با محتویات هرتیوپ را درون هر چاهک لود می کنیم .

پس از ریختن نمونه به داخل چاله های ژل آنرا به مدت ۳/۵ ساعت با ولتاژ ۲۰۰ الکتروفوز می کنیم.

رنگ آمیزی نیترات نقره

اولین مرحله پس از اتمام الکتروفورز خارج کردن ژل از میان شیشه ها است برای این کار با استفاده از کارد پهن بین دو شیشه فاصله ایجاد می کنیم و آنها را از هم جدا می کنیم . سپس ژل را درون ظرف رنگ آمیزی قرار می دهیم . جهت ثابت کردن DNA بر روی ژل ابتدا ۲۰۰ میلی لیتر محلول اسید الکل یا محلول A (۱ ml اسید استیک+ ۲۰ ml الکل ۹۶٪ که با آب مقطر به حجم ۲۰۰ میلی لیتر رسانده شده است) را داخل ظرف ریخته و به مدت ۳ دقیقه به آرامی تکان می دهیم یا روی shaker قرار می دهیم سپس محلول قبلی را دور ریخته و دوباره عمل شستشو با اسید الکل را تکرار می کنیم .

جهت رنگ آمیزی ژل از محلول نیترات نقره ۰/۱٪ (محلول B شامل ۰/۱۵ گرم نیترات نقره که حجم آن با آب مقطر به ۱۰۰ میلی لیتر رسیده) استفاده می کنیم . پس از خارج کردن محلول قبلی به آرامی مقدار ۲۵۰ میلی لیتر از محلول فوق را داخل ظرف ریخته و آنرا به مدت ۱۵ دقیقه تکان می دهیم (Shaking) . نیترات نقره به DNA متصل می شود.

در مرحله بعدی محلول B را به آرامی خارج کرده و ژل را با آب مقطر شستشو می دهیم . سپس مقدار ۲۵۰ میلی لیتر محلول C (یعنی NaOH 1.5gr که با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شده است.) را اضافه کرده و سپس ۱ میلی لیتر فرمالدئید اضافه کرده (مستقیم روی ژل ریخته نشود) و تا ظاهر شدن بندها (حدود ۱۵ دقیقه) آنرا به آرامی تکان می دهیم .

سپس با آب مقطر شستشو داده و ژل را سیل می کنیم. سپس باندهای حاصل را مورد بررسی قرار می‌دهیم.